

Aus dem Institut für
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**DER EINFLUSS EINIGER CHEMOTHERA-
PEUTIKA AUF THEILERIA ANNULATA
(DSCHUNKOWSKY UND LUHS, 1904) -
SCHIZONTEN UND DIE LYMPHO-
BLASTOIDEN WIRTSZELLEN IN VITRO**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gesa Kohlmeyer
Tierärztin aus Bremen

Berlin 1983
Journal-Nr. 1139





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546618_0028

Aus dem Institut für
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

DER EINFLUSS EINIGER CHEMOTHERAPEUTIKA AUF
THEILERIA ANNULATA (DSCHUNKOWSKY UND LUHS, 1904) -
SCHIZONTEN UND DIE LYMPHOBLASTOIDEN WIRTSZELLEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gesa Kohlmeyer
Tierärztin aus Bremen

Berlin 1983
Journal-Nr. 1139

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:

Prof. Dr. F. Hörchner

Referent:

Prof. Dr. E. Schein

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. W. Löscher

Tag der Promotion: 21. Oktober 1983

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

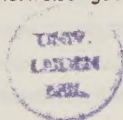
	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	5
2. LITERATURÜBERSICHT	
2.1 Entwicklung und Verlauf der Theileria annulata-Infektion	6
2.2 Kultivierung von Theilerien	7
2.3 Behandlung der Theileriose	
2.3.1 Bisherige Versuche zur Chemotherapie	9
2.3.2 Kurze Beschreibung der von mir verwendeten Chemotherapeutika	15
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
3.1 Material und Methoden	23
3.2 Ergebnisse	28
Einfluß verschiedener Chemotherapeutika auf die Schizonten von Theileria annulata und deren Wirtszellen in vitro	
3.2.1 Halofuginon-Hydrobromid	28
3.2.2 Halofuginon-Aceturat	32
3.2.3 Halofuginon-Lactat	35
3.2.4 Parvaquone	37
3.2.5 Bay g 7183	39
3.2.6 Arprinocid	41
3.2.7 Lasalocid	43
3.2.8 Salinomycin	45
4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	55
5. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	62
6. LITERATURVERZEICHNIS	64

1. EINLEITUNG

Theileria (T.) *annulata* (DSCHUNKOWSKY und LUHS, 1904), der Erreger des Mittelmeerfiebers, tritt in vielen subtropischen Ländern auf und ruft eine volkswirtschaftlich bedeutende Seuche bei allen Rinderrassen hervor. Der Erreger wird unter natürlichen Bedingungen durch Zecken der Gattung *Hyalomma* während der Blutmahlzeit übertragen. Aufgrund des weiten Verbreitungsgebietes dieser Theileriose fehlen genaue Angaben über das gesamte Ausmaß der Verluste.

Ein spezifisch wirksames und gleichzeitig wirtschaftliches Chemotherapeutikum fehlt in der Praxis bis heute. Durch Vakzination und passive Immunisierung wurden in begrenzten Gebieten zwar Teilerfolge erzielt, ein zuverlässiger Schutz vor der Erkrankung konnte jedoch bisher nicht erreicht werden. So beschränkt sich die Bekämpfung der Theileriose im Wesentlichen auf die Vernichtung der Überträgerzecke. Durch zunehmende Ausbildung akarizidresistenter Populationen erwies sich diese Methode als wenig effektiv, zumal sie bei halbnomadisierender Viehhaltung organisatorisch und finanziell sehr aufwendig ist und damit die Wirtschaftlichkeit dieser Maßnahme fraglich bleibt.

Die Wirtsspezifität von *Theileria annulata* nur für Rinder - kleine Nager oder andere Labortiere lassen sich nicht infizieren - machte es bisher erforderlich, Wirksamkeitsprüfungen von Theileriziden ausschließlich am Rind durchzuführen. Da sich aber Schizonten von Theilerien gut in der Zellkultur vermehren lassen und bereits "screening" von Arzneimitteln gegen Theilerien *in vitro* beschrieben wurde (HAWKING, 1958; McHARDY, 1978; UILENBERG et al., 1980), war es meine Aufgabe, unter Verzicht auf kostenaufwendige Tierversuche die Wirkung von Chemotherapeutika, hier speziell einiger Kokzidiostatika, auf *in vitro* kultivierte *Theileria*-Schizonten zu untersuchen. Die bis auf eine Ausnahme zur Gruppe der Kokzidiostatika gehörenden Substanzen wurden deshalb ausgewählt, weil die Entwicklungsstadien von Theilerien ultrastrukturelle Ähnlichkeit mit denen der Kokzidien haben und damit möglicherweise geeignete Angriffspunkte für eine Therapie bieten.



2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Entwicklung und Verlauf der Theileria annulata-Infektion

Das Verbreitungsgebiet des Mittelmeergefiebers der Rinder erstreckt sich hauptsächlich von Nordafrika und den östlichen Mittelmeerländern über den Mittleren Osten bis nach Zentralasien (NEITZ, 1957). Voraussetzung für eine Infektion beim Rind ist das Vorhandensein des Überträgers, so daß die Erkrankung endemisch in einem für die Überträgerzecke geeigneten Biotop auftritt. Empfänglich sind prinzipiell alle Rinderrassen, es hat sich jedoch gezeigt, daß Hochleistungsrassen einer besonderen Disposition unterliegen (PIPANO, 1976).

Während einer Theileria annulata-Infektion, die akut oder chronisch verlaufen kann (SERGENT et al., 1945), kommt es zuerst zum Befall des lymphatischen Systems und später auch der Erythrozyten. Nach Inokulation der Theileria annulata-Sporozoit durch die übertragende Zecke und einer Präpatenz von 7-10 Tagen, in der der Verbleib des Parasiten im Wirtstierorganismus noch ungeklärt ist (NEITZ, 1957; BARNETT, 1968), treten die klinischen Symptome auf. Als erstes Krankheitszeichen zeigt das infizierte Rind eine Schwellung des regionalen Lymphknoten, die nach 1-2 Tagen auch die übrigen Körperlymphknoten erfaßt und mit Körpertemperaturen von über 41°C einhergeht. Zu diesem Zeitpunkt sind im Lymphknotenpunkt Makroschizonten, sog. KOCH'sche Kugeln, in den Lymphozyten nachweisbar. Anschließend differenziert sich ein Teil der Makroschizonten zu Mikroschizonten, aus denen bis zu 100 Merozoite entstehen können. Diese dringen aktiv in die Erythrozyten des Rindes ein und können sich bei einer Theileria annulata-Infektion durch Zweitteilung weitervermehren.

Als klinische Symptome treten bei den infizierten Rindern Fieber, Anämie und Ikterus auf, die oft mit Durchfall und Nasenausfluß einhergehen. Weitergehende Angaben über die Symptomatik bei einer Theileria annulata-Infektion finden sich bei GIESECKE und WIESENHÜTTER (1965) und LAIBLIN (1978). Die Vermehrung der Merozoite in den roten Blutkörperchen kann zu einer zeitweilig vorhandenen latenten Infektion führen, ohne daß die Rinder klinisch erkrankt sind. Solche latent infizierten Tiere dienen als Haupterregereservoir (SERGENT et al., 1945; SAMISH und PIPANO, 1976), an dem sich Zecken erneut infizieren können.

Der vollständige Entwicklungszyklus von *Theileria annulata* ist heute weitgehend aufgeklärt (SCHEIN, 1976). Während der geschlechtlichen Vermehrungsphase im Überträger, der Gamogonie, differenzieren sich im Zeckendarm ein Teil der bei der Blutmahlzeit aufgenommenen Merozoite zu männlichen Mikrogameten und weiblichen Makrogameten. Durch ihre Verschmelzung entsteht eine Zygote, die sich zu einem aktiv beweglichen Kineten differenziert, der in die Speicheldrüse der Zecke eindringt. Aus dem daraus entstehenden Sporoblasten entwickeln sich bei der anschließenden Sporogonie zahlreiche Sporozoite, die die für das Rind infektiösen Stadien darstellen und beim Saugakt durch die Zecke übertragen werden. Die Übertragung der *Theileria annulata*-Sporozoite erfolgt nur transstadial, das heißt, die Zecke muß die Merozoite in dem vorausgegangenen Stadium aufgenommen haben. Eine transovariable Übertragung direkt auf die Nachkommen wie bei den Babesien ist nicht möglich.

2.2 Kultivierung von Theilerien

Bisher war es nicht möglich, die erythrozytären Stadien von Theilerien in der Zellkultur zu halten und zu vermehren (HOSHMAND-RAD, 1975).

TSUR (1945) gelang es dagegen erstmals, Schizontenstadien von *Theileria annulata*, die aus Milz- und Lymphknotenmaterial infizierter Tiere gewonnen wurden, 12 Tage am Leben zu erhalten. Er kultivierte sie in Tyrode's Nährlösung mit einem Zusatz von 30-40% Kälberserum. Bei gemeinsamer Kultivierung mit Milzzellen eines gesunden Tieres, die alle 3-5 Tage erneuert wurden, verlängerte sich die Lebensdauer der *Theileria annulata*-Schizonten auf 15-18 Tage. Zu einer Vermehrung der Parasiten kam es dabei allerdings nicht. Später modifizierte TCHERNO-MORETZ (1947) das Nährmedium durch Zusatz einiger Wachstumsfaktoren wie Aminosäuren und Vitamine und beobachtete daraufhin auch eine Multiplikation der Schizonten. TSUR et al. (1957) führten diese Experimente ebenfalls mit Schizonten von *Theileria parva* durch und konnten sie 15 Tage in Zellkultur halten.

Einen bedeutenden Fortschritt erreichten BROCKLESBY und HAWKING (1958), die in Anlehnung an die Methoden und Ergebnisse von TSUR, aber unter Verwendung eines weiterentwickelten Nährmediums in der Lage waren, *Theileria annulata* 59 und *Theileria parva* 14 Tage in Zellkulturen überleben zu lassen. Die *Theileria*

annulata-Schizonten vermehrten sich und erwiesen sich im Tierversuch als infektiösfähig, die *Theileria parva*-Schizonten zeigten dagegen eine Vermehrung nur während der ersten Tage. Diese Autoren bezweifelte die Notwendigkeit des Zusatzes der von TCHERNOMORETZ (1947) angeführten Wachstumsfaktoren zum Erhalt und zur Vermehrung der Theilerien *in vitro*. TSUR und ADLER (1962) führten dann eine neue Methode bezüglich der Kultivierung von Theilerien ein, indem sie Leber, Milz und Lymphknoten *T. annulata*-infizierter Rinder mechanisch zerkleinerten, anschließend mit Trypsin behandelten und die so gewonnenen Zellen als einschichtigen Zellrasen anzüchteten. Dadurch erreichten sie eine mehrmonatige Lebensdauer und beobachteten eine dauernde Vermehrung der Parasiten, ohne daß frische lymphoide Zellen zugesetzt wurden.

Einen weiteren Schritt vorwärts auf dem Wege der Erforschung des Lebenszyklus der Theilerien bedeuteten die Ergebnisse von HULLIGER et al. (1964) und HULLIGER (1965), die zeigten, daß bei der Teilung der Wirtszellen die *Theileria*-Schizonten annähernd gleichmäßig auf beide entstehenden Tochterzellen verteilt werden. Die Autoren fanden keinen Beweis für die bisher vertretene Annahme von THEILER (1902), daß die Parasiten sich nach intrazellulärer Schizogonie zu Merozoiten entwickeln und andere nichtinfizierte lymphoide Zellen befallen. Diese Beobachtungen bestätigten auch die Ergebnisse von TSUR und ADLER (1962). Die deutlich gesteigerte Zellteilungsrate von *Theileria*-infizierten Zellen ließ HULLIGER et al. (1964) vermuten, daß Theilerien als Stimulans wirken und die Zellteilung ihrer Wirtszelle in verstärktem Maße induzieren. Sie verwendeten zur Kultivierung Eagle's Medium und züchteten die Rinderzellen in Verbindung mit einem zur Ernährung dienenden Zellrasen aus Hamsternierenzellen, deren Anwesenheit ihrer Meinung nach zur optimalen Vermehrung der Theilerien nötig war.

In den folgenden Jahren wurde die *in vitro*-Züchtung von *Theileria*-Schizonten von verschiedenen Autoren beschrieben, die sie teils als Zellrasen (TSUR und ADLER, 1965; ZABLOTSKII, 1967) und teils in Suspension (ENDE und EDLINGER, 1971; MUTUZKINA, 1975; HOSHMAND-RAD, 1975) kultivierten. HOSHMAND-RAD (1975) konnte das Wachstum von *Theileria annulata*-infizierten Lymphoblasten durch Zugabe von Lactalbumin-Hydrolysat und Hefeextrakt steigern, was die Etablierung von Zellkulturen aus vergleichsweise wenigen infizierten Zellen möglich machte.

MALMQUIST et al. (1970) arbeiteten mit *Theileria parva* und beschrieben eine Transformation der Wirtszelle vom Lymphozyten zu einer lymphoblastoiden Zelle, hervorgerufen durch Sporozoite, die die Wirtszelle in verstärktem Maße zur Teilung anregen. Ebenso wenig wie HULLIGER et al. (1964) gelang es ihnen, eine extra-zelluläre Form des Parasiten nachzuweisen, die in der Lage wäre, andere nicht-infizierte Lymphozyten zu befallen.

Seit in neuerer Zeit die Verwendung standardisierter definierter Nährmedien üblich geworden ist, bereitet es keine Schwierigkeiten mehr, *Theileria annulata*- und *Theileria parva*-Schizonten in Lymphoblastoidzellen über viele Passagen in vitro zu halten und zu vermehren.

2.3 Behandlung der Theileriose

2.3.1 Bisherige Versuche zur Chemotherapie

Schon seit die Ätiologie der Theileriose bekannt ist, hat es Versuche gegeben, diese auch medikamentell zu behandeln. Die Arbeit von NEITZ (1957) bietet einen Überblick über die bis dahin gegen Theilerien überprüften Substanzen, von denen jedoch keine eine spezifische Wirkung gezeigt hatte.

Da der Entwicklungszyklus der Malaria- und Babesioseerreger ähnlich abläuft und vergleichbare Entwicklungsstadien auftreten wie bei einer *Theileria*-Infektion, lag es nahe, die Wirkung von Malariziden und Babesiziden auch gegen Theilerien zu untersuchen. Bei dem von *T. parva* hervorgerufenen Ostküstenfieber hatten mehrmalige Gaben von Pamaquin während der Präpatenz und Patenz zwar zu einer zahlenmäßigen Verminderung und teilweisen Degeneration der Piroplasmen geführt, dagegen wurde die Entwicklung der Schizonten und damit der Krankheitsverlauf nicht beeinflusst. Dieselbe ausschließlich auf die erythrozytären Stadien beschränkte Wirkung des Pamaquin stellte NEITZ (1951) auch bei *Theileria annulata* fest. Behandlungsversuche mit anderen Malariziden gegen die *T. annulata*-Infektion beschreiben auch PEREPONOV und NECHAEV (1963), die infizierte Rinder im Anfangsstadium der Infektion mit einer Kombination von Primaquin und Mepacrin insgesamt 7-8 Tage und zusätzlich symptomatisch behandelten und eine klinische Heilung aller Tiere erzielen konnten. Auch RAKHIMOV und SHMUNK (1974) erhielten nach oraler Verabreichung eines Kombinationspräparates aus Mepacrin, Proguanil und Plasmocid über 4-5 Tage einerseits und Chloroquin über 6-7 Tage

andererseits befriedigende Ergebnisse. AWAD (1962) therapierte natürlich mit *Theileria annulata* infizierte und akut erkrankte Rinder mit einer Kombination aus Resochin und Penicillin und bewirkte damit ein Absinken des Fiebers auf physiologische Werte am 4. Tage, ein Verschwinden der Schizonten 10 Tage und der Piroplasmaen 16 Tage nach der Behandlung. RADKEVICH (1960) verwendete eine Kombination aus insgesamt 10 chemotherapeutisch unterschiedlich wirksamen Substanzen, die in verschiedener Zusammensetzung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen an *Theileria annulata*-infizierte Rinder verabreicht wurden und konnte 19 von 25 Tieren heilen, während sich nur die Hälfte der Kontrolltiere wieder erholte. Im Folgenden modifizierte er die Zusammensetzung der Präparate und behandelte die Tiere zusätzlich symptomatisch, was den Behandlungserfolg noch verbesserte (RADKEVICH, 1961; 1966).

HAWKING (1963) faßte die Therapieversuche verschiedener Autoren zusammen und wies auf die widersprüchlichen Aussagen bezüglich der Wirksamkeit der untersuchten Substanzen hin. Er kritisierte gleichzeitig das häufige Fehlen von infizierten, unbehandelten Kontrolltieren, was die Aussagekraft der Versuche insgesamt verringert, da bei einer *Theileria annulata*-Infektion eine spontane Heilung nicht selten auftritt. Dieser Umstand bedingt sicher auch einige der in den folgenden Jahren aufgetretenen Widersprüche hinsichtlich der Wirkung bestimmter Chemotherapeutika.

Nach den Feldbeobachtungen von GIESECKE und WIESENHÜTTER (1965) erwiesen sich die zunächst gegen eine *Theileria annulata*-Infektion für wirksam gehaltenen Babesizide Acaprin^R und Berenil^R bei europäischen Rinderrassen als wirkungslos, während einheimische Rassen eine gute Heilungstendenz zeigten. Ebenfalls konnte PIPANO (1964) mit fünf an aufeinanderfolgenden Tagen verabreichten Injektionen von Berenil^R am Ende der Präpatenz keine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes erreichen. POPOV (1969) testete verschiedene Kombinationen pharmakologisch unterschiedlich wirksamer Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegen *Theileria annulata* in Behandlung und Chemoprophylaxe und hielt Diminazen (Berenil^R) kombiniert mit Sulfamidin für das effizienteste. Nach den Untersuchungen von RAKHIMOV und SHMUNK (1974) konnten 10 alternierend injizierte Gaben von Diminazen (Berenil^R) und Proguanil in 225 von 245 Fällen eine Heilung bewirken.

EL REFAII und MICHAEL (1976) beschrieben eine durch Blutausstriche nachgewiesene Eliminierung von *T. annulata*-Merozoiten aus den Erythrozyten von natürlich infizierten, subklinisch erkrankten Rindern nach subcutaner Applikation von Imido-carb-dipropionat. Insgesamt jedoch hielten sie die Therapiemöglichkeiten bei einer *T. annulata*-Infektion nach wie vor für unbefriedigend.

In seiner umfassenden Arbeit über die Therapie gegen das Ostküstenfieber veröffentlichte WILDE (1967) die Ergebnisse eines "screening" von über 170 Substanzen im Tierversuch, von denen das Antimalariamittel Pyrimethamin in Kombination mit Sulfonamiden die besten Ergebnisse brachte. Ein für die Behandlung in der Praxis geeignetes Mittel befand sich jedoch nicht darunter. Neben den Malariziden und Babesiziden wurden auch unspezifisch gegen Protozoen wirksame Therapeutika wie das Tetrazyklin in die Untersuchungen miteinbezogen. NEITZ (1953) stellte fest, daß Chlortetrazyklin (Aureomycin), wenn es während der Präpatenz wiederholt l.v. verabreicht wurde, eine deutliche Wirkung auf *T. parva*-Schizonten zeigt. Ihre Anzahl nahm bis zur Grenze der Nachweisbarkeit rasch ab, während die erythrozytären Stadien noch 1-5 Tage nach völligem Verschwinden der Schizonten vorhanden waren. Die Merozoiten wurden offensichtlich nicht direkt beeinflußt, sondern Aureomycin verhindert die Teilung der mit Schizonten befallenen Lymphknochenzellen. Die infizierten Tiere entwickelten nur geringe Krankheitssymptome, aber nach der Genesung eine solide Immunität. Erfolgte die Behandlung mit Aureomycin allerdings erst nach Auftreten der klinischen Symptome, so wurde der Krankheitsverlauf nicht beeinflußt. Obwohl CORDIER und GAYOT (1954) die Unwirksamkeit von Chlortetrazyklinen bei der Behandlung des Mittelmeerfiebers beschrieben, nahm NEITZ (1957) an, daß eine Verabreichung während der Präpatenz einen ähnlichen Effekt zeigen würde wie beim Ostküstenfieber. Anschließend Versuche haben gezeigt, daß Oxytetrazyklin (Terramycin) eine vergleichbare Wirkung gegen *T. parva* besitzt wie Aureomycin. Eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes durch eine Terramycinbehandlung bei Auftreten der ersten Symptome war offensichtlich nicht möglich (NEITZ, 1957). Die Gabe von Kombinationspräparaten von Aureomycin bzw. Terramycin und Pamaquin, beginnend am 1. Fiebertag, bewirkte erst bei 10-17 intravenösen Injektionen in 24stündigen Intervallen eine Erholung der schwer erkrankten Tiere (NEITZ, 1957). Bei entsprechender Verabreichung vom 3. Fiebertag an konnte dieser Effekt nicht mehr erzielt werden (NEITZ, 1959). Danach scheinen Tetrazykline für den therapeutischen Einsatz in der Praxis ungeeignet, allerdings

bietet sich die Möglichkeit zur Chemoprophylaxe. Aufbauend auf diesen Erfahrungen setzten BARNETT und BAILEY (1958) Aureomycin über 28 Tage bei einer *T. parva*-Infektion mit Beginn der Infestation der infizierten Zecken ein. Ihre Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse von NEITZ (1957). BROCKLESBY und BAILEY (1962, 1965) hielten diese Methode bei Verwendung von Chlor- und Oxytetracyklinen als Chemoprophylaxe für geeignet, eine kleinere Anzahl von Tieren zu vakzinieren, jedoch nicht geeignet für eine Massenimmunisierung. Die Effektivität von Chlor- und Oxytetracyklinen beim Einsatz in der Immuno-Chemoprophylaxe des Ostküstenfiebers bewiesen später auch die Arbeiten von JARRETT et al. (1969) und BROWN et al. (1977b).

BROWN et al. (1977a) konnten jedoch auch im patenten Stadium der Infektion Erfolge erzielen. Sie behandelten *Theileria parva*-infizierte Rinder parenteral mit Methyltetracyklinen, beginnend mit dem 1. Makroschizontennachweis im Lymphknotenpunktat und mit Oxytetracyklinen bereits am 1. Fiebertag, wobei von den insgesamt 15 Tieren 13 überlebten. RADLEY et al. (1975) konnten experimentell *T. parva*-infizierte Rinder durch Gabe von Oxytetracyklinen, die erstmals am Tag der Infektion und dann an drei weiteren Tagen erfolgte, sicher vor einer bei allen unbehandelten Kontrolltieren tödlich verlaufenden Infektion schützen. Später erwiesen sich bereits zwei Dosen eines Kurzzeittetracyklins als ausreichend, während mit der Entwicklung eines langwirkenden Tetracyklins (Terramycin LA) schon eine einmalige Gabe am Tag der Infektion eine adäquate Prophylaxe bewirkte (RADLEY, 1981). Dagegen kamen HASHEMI-FESHARKI und SHAD-DEL (1974) zu dem Ergebnis, daß Oxytetracykline zu Beginn des patenten Stadiums oder später keinen Einfluß auf den Verlauf einer *T. annulata*-Infektion nehmen. GILL et al. (1976) immunisierten *T. annulata*-infizierte Rinder in Anlehnung an die Methode von NEITZ (1957) und BARNETT und BAILEY (1958) mit oral verabreichten Chlortetracyklinen während der Präpatenz und erreichten bei den Tieren eine gut ausgebildete Immunität bei homologer Belastungsinfektion. Weitere Angaben über Therapieversuche beim Mittelmeerfieber mit unterschiedlichem Erfolg finden sich bei JOYNER und BROCKLESBY (1973).

Bei der Suche nach besser wirksamen Theileriziden bemühte man sich, die kostenintensiven Tierversuche durch *in vitro*-Modelle zu ersetzen. Hierbei ließ man die zu untersuchenden Substanzen auf in Zellkultur gehaltene *Theileria*-Schizonten einwirken. Diese Methode erwies sich vor allem für das "screening" als billiger und bequemer.

HAWKING (1958) untersuchte 40 verschiedene Substanzen auf ihre Aktivität gegen *T. annulata* in der Zellkultur. Trotz des offensichtlichen Mißerfolges befürwortete er die Methode und schlug weitergehendes systematisches "screening" anderer Substanzen vor.

In einer umfangreichen Versuchsserie stießen MCHARDY et al. (1976) auf das Antimalariamittel Menocton, das als einziges eine ausgeprägte Aktivität gegen *T. parva*-Schizonten ohne gleichzeitige Schädigung der Lymphoblastoidzelle zeigte. Unter den übrigen untersuchten Chemotherapeutika befanden sich auch viele bisher in vivo als wirksam beschriebene Substanzen wie Chloroquin, Mepacrin, Pamaquin, Pyrimethamin, Imidocarb, Diminazen und Oxytetrazyklin, die in vitro keinen Einfluß auf die Vermehrung der Schizonten hatten. Auch in vivo konnte eine Effizienz von Menocton an *T. parva*-infizierten Rindern bestätigt werden (MCHARDY, 1978). In einer weiteren in vitro-Untersuchung an über 40 Substanzen, darunter Antimalariamittel, Kokzidiostatika und andere protozoenwirksame Mittel sowie Antimetaboliten, antiviral wirksame Komponenten und Oxytetrazykline zeigten nur Menocton und Methothrexat eine signifikante Wirkung, wobei der Effekt des Menocton wesentlich ausgeprägter war (MCHARDY, 1978). In der optimalen Konzentration von 1 ppm reduzierte es die Befallsrate der Lymphoblasten von 97-98% nach 48 Stunden Einwirkung auf 25% bei *T. parva* und 31% bei *T. annulata*, wie in GIEMSA-gefärbten Ausstrichen der behandelten Zellen nachgewiesen wurde. Kombinationspräparate von Menocton mit anderen Therapeutika erwiesen sich als nicht sinnvoll.

Bei einem Vergleich verschiedener Applikationsformen zeigte die intramuskuläre Verabreichung bei experimentell mit *T. parva*-infizierten Rindern die beste Wirkung, während Menocton bei oraler Gabe offensichtlich sehr schlecht resorbiert wird und den Krankheitsablauf kaum beeinflußt. Trotz der überzeugenden Wirkung besitzt Menocton einen erheblichen Nachteil, der es für den Einsatz in der Praxis ungeeignet macht: aufgrund seiner chemischen Struktur ist die Synthesisierung schwierig und teuer. Deswegen wurden eine Reihe chemisch verwandter, aber einfacher herstellbarer Substanzen entwickelt, von denen "Compound 993C" (Parvaquone) den größten Effekt versprach (MCHARDY, 1979). Bei einer Konzentration von 1 ppm im Nährmedium einer *T. parva*-Zellkultur enthielten nach 48 Stunden Inkubationszeit von anfangs annähernd 100% nur noch 15% der Zellen einen sichtbaren Schizonten und die Anzahl der Chromatinpartikel wurde von durchschnittlich 10 auf 2 reduziert. An GIEMSA-gefärbten Ausstrichen der behan-

delten Zellen war eine Auflockerung der Chromatinstruktur der Schizonten und meist gleichzeitig eine schwächere Anfärbbarkeit zu beobachten. Teilweise kam es auch zur völligen Auflösung der Schizonten. Auch im Tierversuch zeigte "Compound 993C" (Parvaquone) in einer einmaligen Dosis von 20 mg/kg KG bei der Behandlung von klinisch an Ostküstenfieber erkrankten Rindern eine gute Wirkung, während niedrigere Dosierungen sich als nicht so effektiv erwiesen.

Neben der seit der Arbeit von MCHARDY et al. (1976) bekannten Wirkung des Menocton demonstrierten SCHEIN und VOIGT (1979) die chemotherapeutische Aktivität des Kokzidiostatikums Halofuginon bei *T. parva*- und *T. annulata*-Infektionen. Experimentell infizierte Rinder wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach Auftreten der klinischen Symptome und dem Nachweis der Schizonten im Lymphknotenpunktat mit Halofuginon in einer Dosis von 1,2 mg/kg KG per os therapiert. Alle behandelten Tiere überlebten, sogar diejenigen, welche sich zum Zeitpunkt der Behandlung in äußerst schlechter Kondition befanden, die Kontrolltiere dagegen starben. Die überlebenden Tiere entwickelten eine solide Immunität gegen eine homologe Belastungsinfektion. Diese Erkenntnisse lassen hoffen, daß Halofuginon in der Therapie wie in der Immunoprophylaxe einsetzbar ist. Bestätigt wurden die Ergebnisse von UILENBERG et al. (1980), die klinisch an Ostküstenfieber erkrankte Rinder mit einer oralen Dosis von 1-2 mg/kg KG heilen konnten. Zusätzlich beobachteten sie eine deutliche Verminderung der Anzahl schizontenbefallener Lymphoblasten in vitro in Konzentrationen 0,02 - 0,01 ppm, die aber gleichzeitig auch eine gewisse Toxizität für die Wirtszelle besitzen.

Bei den bisherigen "screening tests" gegen *Theileria annulata* in vitro wurde der Einfluß der Therapeutika auf die Schizonten und die umgebende Wirtszelle nur lichtmikroskopisch untersucht. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, die Wachstumsrate indirekt über den Einbau der radioaktiv markierten Nukleinsäurevorstufen ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin festzustellen. Diese werden dem Nährmedium zugesetzt und bei der Reduplikation der Basenstränge während der DNS-Synthese eingebaut. Die Radioaktivität der Zelle ist also ein Maß für ihre Vermehrungsrate. Aufgrund der Untersuchungen von BÜNGENER und NIELSEN (1967), PEROTTO et al. (1971), VAN DYKE (1975), IRVIN und STAGG (1977), IRVIN et al. (1978), IRVIN und YOUNG (1979) und IRVIN et al. (1981) ist bekannt, daß ^3H -Hypoxanthin in die DNS verschiedener intrazellulär vorkommender Protozoen eingebaut wird, während

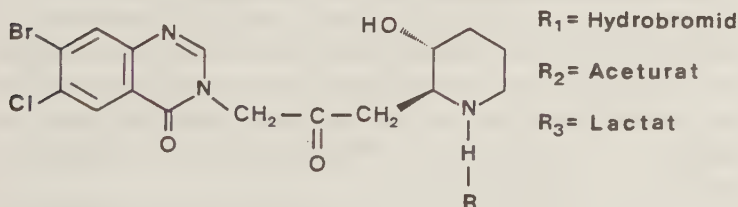
der Einbau in die Wirtszelle unbedeutend ist (IRVIN und YOUNG, 1979). So schlugen IRVIN und YOUNG (1977) für in vitro-"screening tests" von Therapeutika gegen Babesien und andere Hämoprotezoen Markierung mit ^3H -Hypoxanthin vor, um eine eventuelle Hemmung der parasitären Nukleinsäuresynthese festzustellen.

^3H -Thymidin dagegen wird nicht oder nur ganz gering in parasitäre DNS (IRVIN et al., 1978; IRVIN et al., 1981), wohl aber in Warmblüterleukozyten inkorporiert.

2.3.2 Kurze Beschreibung der von mir verwendeten Chemotherapeutika

a) Name: Halofuginon (Stenorol^R)

Chemische Formel:



Halofuginon

dl-trans-7-bromo-6-chloro-3- [3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl] -4-(3H)-chinazolinon-hydrobromid

-aceturat

-lactat

(Produktinformation Hoechst AG)

Hersteller: Fa. Roussel-Uclaf, Paris, France

Vertrieb für BRD: Hoechst AG, Frankfurt

Toxizität: LD₅₀ bei oraler Verabreichung

für die Maus 4,5 mg/kg KG

für die Ratte 30 mg/kg KG

für das Küken 17,6 mg/kg KG (KAEMMERER und SEIDLER, 1976)

Halofuginon ist ein synthetisches Derivat des aus der Wurzel von *Dichroa febrifuga* isolierten Alkaloids Febrifugin, dessen malarizide Eigenschaften beim Menschen in China seit Jahrhunderten bekannt sind (KUEHL et al., 1948; KOEPFLI et al., 1949; CHOU, 1954). Neben einer guten Wirkung gegen Plasmodien beim Geflügel besitzt Halofuginon ein breites Wirkungsspektrum, das alle bedeutenden pathogenen Eimeriaarten des Geflügels umfaßt (YVORE et al., 1974). Bei einer Dauermedikation von 3 ppm im Futter schützt es zuverlässig vor der Infektion, ohne die Gewichtszunahme zu beeinflussen (YVORE et al., 1974). MANUEL und TROVELA (1977) beschreiben in einer Dosierung von 12 ppm im Futter bei dreimonatiger Verabreichungsdauer auch eine gute Wirkung auf den im südostasiatischen Raum vorkommenden Erreger *Leukozytozoon caulleryi*, sie erwähnen aber auch, daß in dieser Dosierung ein nachteiliger Effekt auf die Gewichtszunahme auftritt.

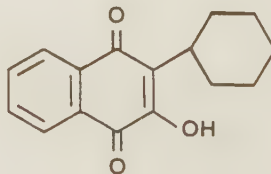
In vitro verwendeten RYLEY und WILSON (1975) Halofuginon in einer Konzentration von 0,01 ppm gegen *Eimeria tenella* und konnten nach 72 Stunden Einwirkungszeit eine vollständige Hemmung der 2. Schizontengeneration erreichen.

HEYDORN et al. (1981) konnten mit einer über 2 oder 4 Tage verabreichten Dosierung von je 0,66 mg/kg KG bei einer akuten Sarkosporidiose von Schafen und Ziegen ebenfalls eine gute Wirkung erzielen. In einer täglichen prophylaktischen Dosis von 0,22 mg/kg KG verhinderte Halofuginon die klinische Erkrankung und die Ausbildung von Zysten, es kam jedoch nicht zur Ausbildung einer belastbaren Immunität.

Der Angriffspunkt des Halofuginon im Entwicklungsablauf der Kokzidien liegt bei den Sporozysten, der 1. und der 2. Schizontengeneration (KAEMMERER und SEIDLER, 1976).

b) Name: Parvaquone (993C)

Chemische Formel:



Parvaquone

2-hydroxy-3-cyclohexyl-1,4-napthoquinon (McHARDY, 1979)

Hersteller: Fa. Wellcome Research Laboratories, Kent, Großbritannien

Toxizität: LD₅₀ bei oraler Verabreichung

für die Maus 3000 mg/kg KG

für die Ratte 3000 mg/kg KG

(MORGAN, pers. Mitteilung)

Parvaquone ist chemisch nahe verwandt mit dem Antimalariamittel Menoclon, das in den letzten Jahren eine große Bedeutung in der experimentellen Behandlung der Theileriose erlangt hat.

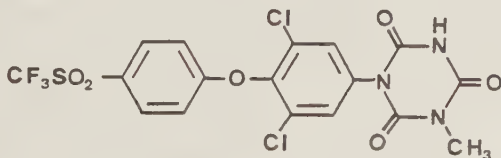
McHARDY (1979) beschrieb die hohe Aktivität von Parvaquone gegen *Theileria parva* in vivo in einer Dosierung von 5 mg/kg KG intravenös, gefolgt von einer täglichen Gabe von 1 mg/kg KG intravenös an 5 weiteren Tagen.

In vitro zeigte Parvaquone eine große chemotherapeutische Aktivität gegen *Theileria parva* in einer Konzentration von 0,1 ppm im Nährmedium.

Der Angriffspunkt von Parvaquone in der Zelle ist bislang noch nicht bekannt.

c) Name: Bay g 7183

Chemische Formel:



Bay g 7183

1-[3,5-dichlor-4-(4'-trifluormethylsulfonyl-phenoxy)-phenyl]-

3-methyl-1,3,5-triazin-2,4,6-(1H, 3H, 5H) trion

(AICHINGER et al., 1978)

Hersteller: Fa. Bayer, Leverkusen

Toxizität: LD₅₀ bei oraler Verabreichung

für die Maus 5000 mg/kg KG

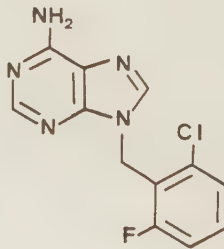
(AICHINGER et al., 1978)

Bay g 7183 besitzt eine hohe Wirksamkeit gegen die bedeutendsten Eimeriaarten des Huhnes bei gleichzeitiger guter Verträglichkeit. In einer Konzentration von 10 ppm im Futter verhinderte die Substanz die Ausbildung klinischer Erscheinungen und die Ausscheidung von Oozysten (AICHINGER et al., 1978). HABERKORN und SCHULZ (1981) stellten eine chemotherapeutische Aktivität auch gegen Kokzidien der Säugetiere fest. Sie untersuchten die Wirkung auf insgesamt 13 verschiedene Eimeria-Spezies von Maus, Ratte, Kaninchen und Schaf und ermittelten eine hohe Wirksamkeit bei Dosierungen zwischen 0,25 mg/kg KG für die Ratte und 10 mg/kg KG für das Kaninchen bei oraler oder dermaler Gabe (pour on-Verfahren).

Nach den Ergebnissen von AICHINGER et al. (1978) beeinflusst Bay g 7183 bei E. maxima die Gamogonie, bei den übrigen Eimerien des Geflügels erstreckt sich die Wirkung auf die 1. Schizontengeneration. HABERKORN und SCHULZ (1981) geben für Säugetierkokzidien Gamogonie- und Schizontenstadien als Angriffspunkte an.

d) Name: Arprinocid (Arpocox^R)

Chemische Formel:



Arprinocid

6-amino-9-(2-chloro-6-fluorobenzyl)purin

(WANG et al., 1979b)

Hersteller: Fa. Merck, Sharpe & Dohme, Rahway, N.J., USA

Toxizität: LD₅₀ für die Maus (männl.) 65 mg/kg KG

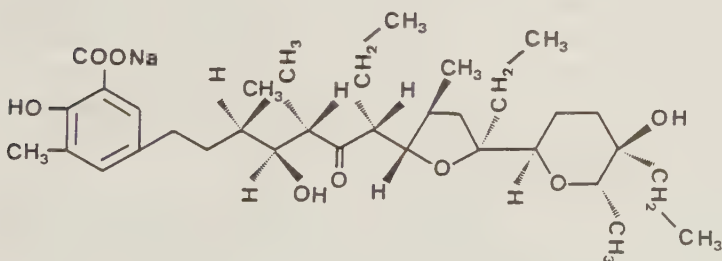
für die Ratte (männl.) 500 mg/kg KG

(Angaben der Fa. Merck, Sharpe & Dohme)

In einer Konzentration von 60 – 70 ppm im Futter zeigte Arprinocid eine gute Wirkung auf verschiedene Eimeriaarten des Huhnes (McMANUS et al., 1976; KIL-GORE et al., 1978). RUFF et al. (1978) behandelten Hühner mit Arprinocid in einer Konzentration von 30 – 70 ppm bereits zwei Tage vor einer experimentellen Infektion mit verschiedenen Eimeriaarten und stellten eine Verminderung der Oozystenausscheidung und eine geringere Infektiosität derselben fest. Die nach einer Arprinocidbehandlung ausgeschiedenen Oozysten besitzen offensichtlich eine geringere Sporulationsfähigkeit, während die Sporulation selber nicht gehemmt wird (TAMAS et al., 1978). Dies wiesen die Autoren nach, indem sie Oozysten von unbehandelten Tieren in vitro in einem arprinocidhaltigen Medium kultivierten und keine Hemmung der Sporulationsfähigkeit bewirkten. Sie folgerten daraus einen Angriff des Arprinocid auf frühere Entwicklungsstadien. Nach den Ergebnissen von WANG et al. (1979a) ist bei Eimeria tenella-infizierten Hühnern bereits die Entwicklung der 1. Schizontengeneration betroffen. Letztere Autoren untersuchten auch den Wirkungsmechanismus von Arprinocid und kamen zu dem Schluß, daß bei In vitro-Kultivierung von Eimerien unter Einfluß von Arprinocid der Einbau von Hypoxanthin in die DNS der Schizonten gehemmt wird. Weitergehende Untersuchungen lassen vermuten, daß die Hypoxanthininkorporation durch kompetitive Hemmung des Arprinocid behindert wird (WANG et al., 1979b).

e) Name: Lasalocid (Avatec^R)

Chemische Formel:



Lasalocid

(6-7 (R)-5 (S)-äthyl-5-(5 (R)-äthyl-tetrahydro-5-hydroxy-6 (S)-methyl-2H-pyran-2 (R)-yl)tetrahydro-3 (S)-methyl-2 (S)-furyl7-4 (S)-hydroxy-3 (R), 5 (S)-dimethyl-6-oxononyl7-2,3-Kresolsäure-Natriumsalz

(Produktinformation Hoffmann-La Roche)

Hersteller: Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

Toxizität: LD₅₀ bei oraler Verabreichung

für die Maus 140 mg/kg KG

(RYLEY und WILSON, 1975)

Lasalocid ist ein kokzidiostatisch wirkendes Antibiotikum, das Ionophore Eigenschaften besitzt, das heißt, es bildet mit ein- und zweiwertigen Kationen Komplexe und beeinflusst so die Permeabilität biologischer Membrane (KAEMMERER und FINK, 1978).

Das erstmalig von BERGER et al. (1951) isolierte Stoffwechselprodukt von *Streptomyces lasaliensis* zeigte in vitro eine gute Wirkung gegen grampositive Bakterien und Pilze (BERGER et al., 1951), wurde aber zunächst weder in der Human- noch in der Veterinärmedizin als Therapeutikum eingesetzt (KAEMMERER und FINK, 1978). Erst MITROVICH und SCHILDKNECHT (1973, 1974) beschrieben den deutlichen Effekt auf verschiedene *Eimeria*-arten des Huhnes. Die von diesen Autoren angegebene Dosierung von 75 ppm im Futter hielten RYLEY und WILSON (1975) unter praktischen Bedingungen für zu gering. Sie erreichten erst mit 150 ppm im Futter eine vollständige Kontrolle der *Eimeria*-Infektionen. Auch in der Zellkultur hemmte Lasalocid in einer Konzentration von 0,01 ppm die Entwicklung der Schizonten, wenn auch nicht immer vollständig (RYLEY und WILSON, 1975).

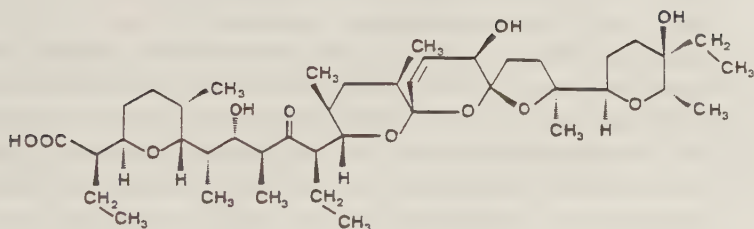
Bei der Behandlung von Säugetierkokzidiosen erwies sich Lasalocid ebenfalls als wirksam. FITZGERALD und MANSFIELD (1979) behandelten *Eimeria*-infizierte Rinder mit einer Dosis von 3 mg/kg KG per os, dies entspricht 112 ppm im Futter, und konnten klinische Erkrankungen und Oozystenausscheidung weitgehend verhindern. Auch in der Prophylaxe der Lämmerkokzidiose zeigte Lasalocid in einer Konzentration von 100 ppm im Futter eine gute Wirkung gegen Mischinfektionen verschiedener *Eimeria*-spezies (FOREYT et al., 1979).

MELTON und SHEFFIELD (1975) konnten in vitro in einer Konzentration von 0,5 µg/ml Nährmedium eine Zellpenetration durch *Toxoplasma gondii* verhindern, in niedrigeren Konzentrationen kam es zwar zum Eindringen des Parasiten in die Zelle, jedoch nicht zur Vermehrung.

Nach Angaben von RYLEY und WILSON (1975) liegt der Angriffspunkt von Lasalocid bei der 1. Schizontengeneration der Kokzidienentwicklung.

f) Name: Salinomycin (Coxistac^R)

Chemische Formel:



Salinomycin

(α R,2R,5S,6R)- α -äthyl-6-[(1S,2S,3S,5R)-5[(2S,5S,7R,9S,10S,12R,15R)-2-((2R,5R,6S)-5-äthyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl)-15-hydroxy, 2,10,12-trimethyl-1,6,8-trioxadispiro [4.1.5.3] pentadec-13-en-9-yl)-2-hydroxy-1,3-dimethyl-4-oxoheptyl]-tetrahydro-5-methyl-2H-pyran-2-essigsäure

(KINASHI et al., 1973)

Hersteller: Fa. Hoechst AG, Frankfurt

Toxizität: LD₅₀ bei oraler Verabreichung

für die Maus 57,4 mg/kg KG

für die Ratte 50,3 mg/kg KG

für das Küken 44,5 mg/kg KG

(Produktinformation Hoechst AG)

Das kokzidienwirksame Polyätherantibiotikum Salinomycin ist ein Stoffwechselprodukt von Streptomyces albus und ähnelt strukturell dem Lasalocid (KINASHI et al., 1973). Es besitzt wie Lasalocid Ionophore Eigenschaften. MIYAZAKI et al. (1974) wiesen auf die Wirkung auf grampositive Bakterien, Mykobakterien und einige Pilze hin, zu deren Behandlung es allerdings in Human- und Veterinärme-

dizin nicht eingesetzt wurde (KAEMMERER und FINK, 1978). Seine Bedeutung erlangte es durch sein breites Wirkungsspektrum bei den wichtigsten Kokzidien des Geflügels in einer Konzentration zwischen 60 und 100 ppm. DANFORTH et al. (1977) beobachteten eine deutlich bessere Wirkung bei 75 ppm im Vergleich zu 50 ppm. MIGAKI et al. (1979), MORRISON et al. (1979) und CHAPPEL und BABCOCK (1979) halten unter Berücksichtigung verschiedener, für die Aufzucht von Mastgeflügel wichtiger Parameter 60 ppm für die sinnvollste Dosierung. Auch GREUEL und RAETHER (1980) raten trotz der höheren Oozystenreduktion bei 75 ppm zu einer kokzidiostatischen Medikation mit 60 ppm, die sich im Hinblick auf die Gewichtszunahme günstiger auswirkt. Sallinomycin als Kokzidiostatikum beeinflußt sowohl die Sporozoitie wie auch die Schizonten der 1. und 2. Generation (Produktinformation Hoechst AG).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

Für die Durchführung der medikamentellen Beeinflussung von *Theileria annulata* in vitro wurden zwei verschiedene Zellkulturen von lymphoblastoiden Zellen verwendet.

1.) In Anlehnung an die Methode von TSUR und ADLER (1962) wurde ein vier Monate altes Kalb der Rasse "Deutsche Schwarzbunte" mit einem Sporozoitenstabilat von *Theileria annulata*, das aus infizierten adulten *Hyalomma anatolicum excavatum*-Zecken gewonnen wurde, subcutan infiziert. Der verwendete *Theileria annulata*-Stamm wurde 1972 in Ankara isoliert und wird seitdem am Institut gehalten und vermehrt (SCHEIN et al., 1975). Nach Auftreten der klinischen Symptome (Körpertemperatur über 40°C) beim infizierten Kalb erfolgte durch aseptische Punktion des stark angeschwollenen Ln. praescapularis die Entnahme schizontenhaltiger lymphoblastoider Zellen. 10 ml des Punktats wurden in 50 ml Falcon Kulturfläschchen (Fa. Greiner, Nürtingen) verbracht und in 40 ml RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10%igem hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum, 1% Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 0,1% Amphotericin (alles Fa. Seromed, München) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank angezüchtet. Nach ca. 24 Stunden sedimentierten die Zellen und bildeten einen einschichtigen Zellrasen.

2.) In Anlehnung an SPOONER und BROWN (1980) wurden Rinderlymphozyten aus dem peripheren Blut mit Sporozoitenmaterial in vitro infiziert. Dazu wurden die Lymphozyten mittels des Dichtegradientenverfahrens mit Ficoll Paque^R aus 50 ml Jugularblut eines nicht infizierten Kalbes isoliert. Anschließend wurden *Theileria annulata*-Sporozoit, die aus den Speicheldrüsen befallener *Hyalomma anatolicum excavatum*-Zecken geonnnen wurden, in 40 ml RPMI 1640 Medium mit den o.g. Zusätzen mit den isolierten Lymphozyten zusammen in sterilen Reagenzröhrchen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Nach durchschnittlich 10 Tagen wurden die Zellen in 50 ml Falcon Kulturfläschchen kultiviert und bis zum Beginn der Versuche ca. 50 Mal passagiert und vermehrt. Zu diesem Zeitpunkt erwiesen sie sich als rundliche, ca. 25-40 µm große, lymphoblastoide Zellen, die nach einer GIEMSA-Färbung einen dunkel-violetten Kern und zartblaues Zytoplasma zeigten. Diese Zellkultur wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

Jede Arbeit an den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Laminar Air Flow-Bank.

Alle für die Theilerizid-Versuche verwendeten Substanzen lagen als Reinsubstanz in Pulverform vor. Nur Halofuginon-Aceturat und Halofuginon-Lactat erwiesen sich als gut wasserlöslich, während die übrigen Therapeutika in kleinsten Mengen von Äthanol gelöst werden mußten.

Der Einfluß folgender Substanzen wurde in den Zellkulturen untersucht:

1. Halofuginon (Stenorol^R)

Hersteller: Fa. Roussel-Uclaf, Paris, Frankreich; Vertrieb für BRD: Hoechst AG, Frankfurt

Halofuginon lag in Form seiner drei Salze als Aceturat, Lactat und Hydrobromid vor.

2. Parvaquone (993C)

Hersteller: Fa. Wellcome Research Laboratories, Kent, Großbritannien.

3. Bay g 7183

Hersteller: Fa. Bayer, Leverkusen

4. Arprinocid (Arpocox^R)

Hersteller: Fa. Merck, Sharp & Dohme, Rahway, N.J., USA

5. Lasalocid (Avatec^R)

Hersteller: Fa. Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz

6. Salinomycin (Coxistac^R)

Hersteller: Fa. Hoechst AG, Frankfurt

Bei der Dosierung der Substanzen in der Zellkultur habe ich mich an bereits vorhandenen Konzentrationsangaben in der Literatur orientiert (McHARDY, 1978; RILEY und WILSON, 1975; UILENBERG et al., 1980). Zur Ermittlung des optimalen Wirkstoffspiegels gegen *Theileria annulata*-Schizonten wurde der Einfluß der Therapeutika in Konzentrationen von 100 ppm bis 0,01 ppm überprüft. Die zu untersuchenden Substanzen wurden im Nährmedium gelöst. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung von 250 ppm (5 mg der Substanz auf 20 ml Medium) hergestellt, die anschließend weiterverdünnt wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung der Kokzidiostatika im Nährmedium und damit eine gleichmäßige Konzentration des

Wirkstoffes an den Zellen zu erreichen, war es bei den schlecht wasserlöslichen Therapeutika erforderlich, diese in kleinen Mengen Äthanol zu lösen. So wurden jeweils 5 mg des wasserunlöslichen Therapeutikums in 50 µl absolutem Alkohol unter kräftigem Schütteln gelöst, zunächst 1 ml Nährmedium zugegeben, auf 37°C erwärmt und unter ständigem Schütteln, nötigenfalls nochmaliger Erwärmung in insgesamt 20 ml Nährmedium gelöst. Die Konzentration des Therapeutikums in der Stammlösung betrug dann 250 ppm, die Konzentration des Alkohols 0,25%. Die Stammlösung wurde anschließend zu den gewünschten Konzentrationen weiterverdünnt, wobei die höchste verwendete Konzentration 100 ppm einer Alkoholkonzentration von 0,1% im Medium entsprach. Diese Alkoholkonzentration war in einem Vorversuch als nicht zellschädigend ermittelt worden, gleichzeitig wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle mitgeführt, deren Nährmedium 0,1% Alkohol zugesetzt worden war.

Die Konzentration des Therapeutikums im Nährmedium wurde beim Ansetzen der Verdünnungsstufen zunächst verdoppelt, da das Medium später 1 : 1 mit der Zellsuspension verdünnt und so die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde. Die Kulturzellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden mit den gelösten Substanzen inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden insgesamt 5 Methoden zur Feststellung des Einflusses der Therapeutika auf die *Theileria annulata*-Schizonten verwendet:

1. Für die Vitalfärbung wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette kräftig vom Boden der Kulturfläschchen abgespült und die so erhaltene Zellsuspension mit 400 x g 10 min. bei + 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Anzahl der Zellen/ml in einer Zählkammer nach NEUBAUER festgestellt. Nach Einstellen der Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen/ml wurden 5×10^5 Zellen mit 500 µl des im Medium gelösten Therapeutikums in der gewünschten Konzentration bebrütet. Gleichzeitig wurden unbehandelte infizierte Kontrollzellen in entsprechenden Zellkonzentrationen mitgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte eine Vitalitätsprüfung der lymphoblastoiden Zellen durch Anfärben mit 0,16 %iger Trypanblaulösung (Fa. Merck, Darmstadt) in einer NEUBAUER-Zählkammer. Als nicht lebensfähig galten die Zellen, die den blauen Farbstoff aufgenommen hatten. Es wurden mindestens 400 Zellen ausgezählt und hiervon der Prozentsatz der lebenden Zellen errechnet.

2. Die Bestimmung der Gesamtzahl der Zellen pro ml Zellsuspension nach der Behandlung erfolgte ebenfalls in einer Zählkammer nach NEUBAUER.

3. Zur Bestimmung des Schizontenindex (= Prozentsatz der infizierten Zellen) wurden die lymphoblastoiden Zellen, wie beschrieben, aus der Kultur gewonnen und auf 1×10^6 Zellen/ml Zellsuspension eingestellt. Die Inkubation mit den gelösten Substanzen erfolgte in Mikrotiterplatten (Fa. Costar, Cambridge, Mass., USA) mit Vertiefungen von 16 mm Durchmesser, in die runde Deckgläschen von 15 mm Durchmesser eingelegt wurden.

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit 500 µl des gelösten Therapeutikums in der gewünschten Konzentration bei 37°C mit 5% CO₂ und 96% rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert, ebenso wurden unbehandelte infizierte Kontrollzellen mit Nährmedium ohne Zusatz des Therapeutikums bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Deckgläschen entnommen und die darauf befindlichen Zellen nach GIEMSA angefärbt. Zur Auswertung wurden 400 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der infizierten Zellen festgestellt. Dabei wurde jede lymphoblastoide Zelle, die einen *Theileria annulata*-Schizonten enthielt – unabhängig von Größe und Anzahl der Kerne – als infiziert gewertet.

4. und 5. Der Einfluß der Kokzidiostatika auf die *Theileria annulata*-Schizonten und die lymphoblastoide Wirtszelle wurde zusätzlich durch Markierung mit ³H-Thymidin und ³H-Hypoxanthin (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) nach der Methode von ZWEYGARTH und AHMED (persönl. Mitteilung) untersucht. Diese Autoren konnten nachweisen, daß stimulierte Rinderlymphoblasten während ihrer Wachstumsphase ³H-Thymidin in die DNA einlagern, während ³H-Hypoxanthin vorwiegend in die DNA der Schizonten inkorporiert wird.

Zur Durchführung wurden die aus der Kultur wie vorher beschrieben gewonnenen Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml Zellsuspension eingestellt. 1×10^5 Zellen wurden mit 100 µl Medium, in dem die Substanz in der gewünschten Konzentration gelöst worden war, in sterilen Mikrotiterplatten 96 K (Fa. Greiner, Nürtingen) bei 37°C mit 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Ansatz jeder Konzentration erfolgte 6-fach. 6 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden in jeweils 3 Vertiefungen 20 µl ³H-Thymidin (0,2 µCi/20 µl; spezifische Aktivität 2 µCi/ml) und in die folgenden drei 20 µl ³H-Hypoxanthin (0,2 µCi/20 µl; spezifische Aktivität 1 µCi/ml) einpipettiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen

in einem Zellsammler Mash II (Fa. Flow Laboratories, Bonn) in Filterpapierstreifen (Fa. Zones Industrielles Ferries, France) abgesaugt und über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet. Nach Auslösen der vorgestanzten Papierplättchen aus den Filterpapierstreifen wurden die Plättchen in Szintillationsgefäße Zinsser Polyvials 714 (Fa. Zinsser, Frankfurt) in 6 ml Biofluor Szintillationsflüssigkeit (Fa. New England Nuclear, St. Albany, Boston, USA) gelöst und im β -Counter IS-150-Liquid Scintillation System (Fa. Beckman Instruments GmbH, München) 30 Sekunden gemessen. Die Impulse wurden in counts per minute (cpm) über einen an das Zählgerät angeschlossenen Schreiber (Fa. Teleprint, Berlin) ausgedruckt. Der Versuchsansatz wurde 6-fach pro Konzentration durchgeführt, wobei eine Triplikat ^3H -Thymidin und dem anderen ^3H -Hypoxanthin zugesetzt wurde. Das Ausmaß der Hemmung der Zellteilungsrate von Parasit und Wirtszelle unter Einfluß des Therapeutikums wurde in Prozent angegeben und errechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{(\text{CPM } \bar{x}_{\text{Kontrolle}} - \text{CPM } \bar{x}_{\text{behandelte Zellen}})}{\text{CPM } \bar{x}_{\text{Kontrolle}}} \cdot 100$$

Bei den als Ergebnisse genannten Werten handelt es sich um den aus 3-4 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert. In den Tabellen wurde darunter in Klammern der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben. Bei übereinstimmenden Einzelwerten fehlt die Bereichsangabe.

3.2 Ergebnisse

Einfluß verschiedener Chemotherapeutika auf die Schizonten von *Theileria annulata* und deren Wirtszellen *in vitro*

Die Wirkung der verschiedenen Chemotherapeutika auf die *Theileria annulata*-Schizonten und die lymphoblastoiden Wirtszellen wurde anhand von 5 Parametern, nämlich an der Lebensfähigkeit, dem Zellwachstum, dem Schizontenindex, der Hemmung des ^3H -Thymidin- und des ^3H -Hypoxanthineinbaus ermittelt. Diese Parameter wurden insgesamt 3 mal nach 24-, 48- und 72stündiger Inkubation mit dem Chemotherapeutikum bestimmt. Da nach 72 Stunden die Wirkung der einzelnen Kokzidiostatika sowohl auf die Wirtszelle als auch auf die *T. annulata*-Schizonten am größten war, wurde nur dieser Wert bei der Auswertung der Ergebnisse verwandt.

Auch eine unter optimalen Bedingungen gehaltene Zellkultur enthält immer abgestorbene Zellen, so daß die Anzahl der lebenden Zellen durchschnittlich bei 93-95 % lag. Die Dauer der Kultivierung über 72 Stunden beeinflusste dabei die Lebensfähigkeit nicht.

Das Zellwachstum zeigte in dem beobachteten Zeitraum keine konstante Vermehrungsrate, sondern nach einer anfänglichen Ruhephase erfolgte eine Phase beschleunigter Zellvermehrung, bis nach 48-72 Stunden ein Plateau erreicht wurde.

Der Schizontenindex, d.h. das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen, lag bei den verwendeten Zellkulturen durchschnittlich zwischen 82 und 89%. In dem beobachteten Zeitraum von 72 Stunden war keine Abhängigkeit dieses Parameters von der Dauer der Kultivierung festzustellen. Dies gilt auch für die Hemmung der ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthineinbaurate.

3.2.1 Halofuginon-Hydrobromid

Die Lebensfähigkeit der infizierten unbehandelten Kulturzellen (Kontrollzellen) lag zwischen 94 und 95,5%. Bei allen Zusätzen von Halofuginon-Hydrobromid in Konzentrationen zwischen 50 und 0,5 ppm im Nährmedium war die Überlebensrate

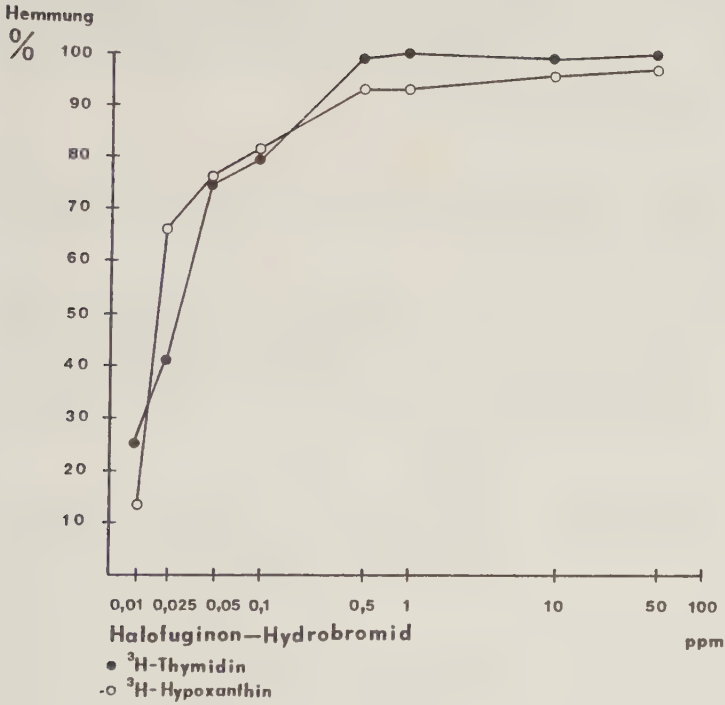
der Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Während bei 0,5 ppm nach 72 Stunden Inkubation im Mittel 41% der Zellen überlebten, waren bei einer Konzentration von 50 ppm nur noch 3% der Zellen lebensfähig. Erst bei Zusätzen unterhalb von 0,5 ppm (0,1 – 0,01 ppm) lag die Überlebensrate der behandelten Zellen im Bereich der Zellkulturen ohne Zusatz (siehe Tabelle 1).

Die Beobachtung des Zellwachstums der infizierten unbehandelten Kulturzellen ergab von der Ausgangskonzentration 5×10^5 Zellen/ml eine Vermehrung auf $15,3 \times 10^5$ Zellen/ml. Bei Zusätzen zwischen 50 und 0,5 ppm Halofuginon-Hydrobromid fand kein Zellwachstum statt. In einer Konzentration von 0,1 ppm im Nährmedium war noch ein geringes Zellwachstum festzustellen, das $8,6 \times 10^5$ Zellen/ml erreichte. Bei Zusätzen zwischen 0,05 und 0,01 ppm Halofuginon-Hydrobromid näherte sich das Zellwachstum mit $12,5 \times 10^5$ Zellen/ml dem Wert der Kontrollzellen und erreichte diesen schließlich (siehe Tabelle 1).

Der Schizontenindex der infizierten unbehandelten Zellen lag in diesem Versuchsdurchgang im Mittel bei 83%. Konzentrationen von 50–0,5 ppm Halofuginon-Hydrobromid erlaubten keine Auswertung, da bei Zusätzen von 50 und 10 ppm kaum noch Zellen, sondern zum größten Teil eine amorphe, schwach angefärbte Masse und vereinzelt Zelltrümmer und Zellschatten vorhanden waren. Alle sichtbaren Zellen waren morphologisch geschädigt. Nach Inkubation mit Konzentrationen von 0,5 ppm und 1 ppm war das Deckglas schwach bewachsen, alle Zellen zeigten deutliche Zelldegenerationserscheinungen wie Kemptyknose und Karyolyse, Schrumpfung des Zelleibes, schaumig-wabliges Zytoplasma und eingezogene Zellränder. Teilweise waren nur Zellschatten ohne erkennbaren Zellkern vorhanden, weiter fielen ungewöhnlich viel Zelltrümmer auf. Das Deckglas der mit 0,1 ppm behandelten Zellen war im Vergleich zur Kontrolle dünner bewachsen, die Zellen wirkten jedoch lichtmikroskopisch intakt. Bei Inkubation mit 0,05–0,01 ppm Halofuginon-Hydrobromid war bei den lymphoblastoiden Wirtszellen morphologisch kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen festzustellen. In diesen Konzentrationen waren in manchen Zellen nur noch vereinzelt Schizonten zu erkennen, die blasser erschienen und deren Konturen weniger deutlich zu erkennen waren als die in den unbehandelten Zellkulturen. Teilweise bereitete es Schwierigkeiten, die Schizonten als solche zu differenzieren, da sie nur noch als Schatten im Zytoplasma der Wirtszelle vorhanden waren.

Der Schizontenindex fiel bei Inkubation mit 0,1 ppm bis 0,01 ppm Halofuginon-Hydrobromid auf 54% und stieg anschließend wieder auf 68% an (siehe Tabelle 1).

Die Einlagerung von tritiummarkiertem Thymidin und Hypoxanthin als Ausdruck der Teilungsfähigkeit wurde grafisch dargestellt und zeigte für mit Konzentrationen zwischen 50 und 0,5 ppm behandelte Zellen eine weitgehende bis vollständige Hemmung der ^3H -Hypoxanthin- wie auch der ^3H -Thymidineinbaureate. Der ^3H -Thymidineinbau war bei Zusatz von 0,1 ppm Halofuginon-Hydrobromid zu 79%, bei 0,025 ppm zu 41% und bei 0,01 ppm zu 25% gehemmt. Die Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus betrug in den angesprochenen Konzentrationen 81%, 67% und 14% (siehe Figur 1).



Figur 1

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Halofuginon-Hydrobromid in verschiedenen hohen Konzentrationen

3.2.2 Halofuginon-Aceturat

Die Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen lag zwischen 94 und 95,5%. Bei den Zusätzen von Halofuginon-Aceturat in den Konzentrationen von 50–1 ppm waren nach Ende der Inkubationszeit keine lebenden Zellen nachzuweisen. Bei 0,5 ppm überlebten 46,5% der Zellen. Bei Konzentrationen von 0,1–0,01 ppm lagen die Überlebensraten mit Werten von 91 bis 94,5% im Bereich der Kontrollzellen (siehe Tabelle 1).

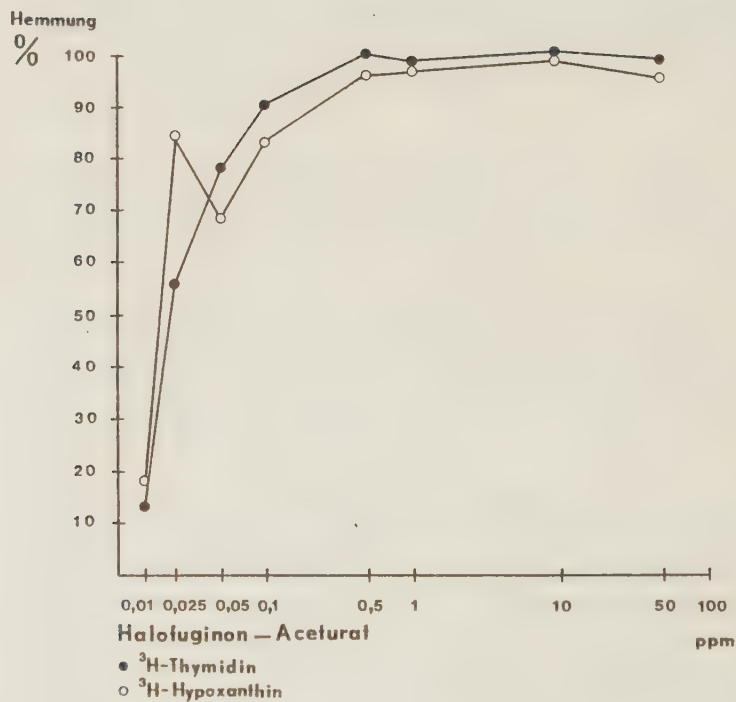
Das Zellwachstum entwickelte sich bei den unbehandelten Kulturzellen zu $16,9 \times 10^5$ Zellen/ml. Bei den Zusätzen von Halofuginon-Aceturat in den Konzentrationen zwischen 50 und 0,5 ppm wurden die Ausgangswerte von 5×10^5 Zellen/ml nicht erreicht.

Die mit 0,1 ppm inkubierten Zellen zeigten eine Vermehrung auf $10,3 \times 10^5$ Zellen/ml. Auch bei Inkubation mit einer Konzentration von 0,05 ppm war das Zellwachstum mit $12,2 \times 10^5$ Zellen/ml geringer als das der nicht behandelten Zellen. Erst bei den Konzentrationen 0,025 ppm und 0,01 ppm wurde die Proliferationsrate der Kontrollzellen erreicht (siehe Tabelle 2).

Der Schizontenindex der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen lag zwischen 82 und 84%. Der Zusatz von Halofuginon-Aceturat in Konzentrationen von 50–0,5 ppm erwies sich als so toxisch, daß der Schizontenindex nicht mehr ermittelt werden konnte. Bei Inkubation mit 1 ppm und 0,5 ppm Halofuginon-Aceturat waren zwar einige Zellen erhalten geblieben, die jedoch deutliche Merkmale einer Zellschädigung wie vorher beschrieben zeigten. Bei einer Konzentration von 0,1 ppm war die Mehrzahl der Zellen lichtmikroskopisch intakt, obgleich das Deckglas im Vergleich zur Kontrolle weniger dicht bewachsen war. Der Anteil der charakteristisch veränderten Zellen war jedoch größer als bei den Kontrollzellen. Bei Inkubation der Zellen mit Halofuginon-Aceturat in Konzentrationen von 0,05–0,01 ppm waren lichtmikroskopisch keine Unterschiede zu den unbehandelten Kulturzellen festzustellen. Bei Zusatz von Halofuginon-Aceturat in Konzentrationen von 0,1–0,01 ppm erreichte der Schizontenindex mit 50% bei einer Verdünnungsstufe von 0,025 ppm den niedrigsten Wert (siehe Tabelle 2).

Die Hemmung des ^3H -Thymidin- und des ^3H -Hypoxanthineinbaus war bei Zusatz von Halofuginon-Aceturat in Konzentrationen von 50–0,5 ppm nahezu vollständig (siehe Tabelle 2). In den Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,01 ppm nahm die

Hemmung der ^3H -Thymidineinbaurrate kontinuierlich von 90% bis auf 13% ab. Der ^3H -Hypoxanthineinbau wurde in diesen Konzentrationen zwischen 82% und 19% gehemmt. Die Konzentrationen 0,1 ppm und 0,025 ppm erzielten eine gleich starke Wirkung, während Halofuginon-Aceturat in der Konzentration 0,05 ppm eine geringere Effektivität besaß (siehe Figur 2).



Figur 2

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Halofuginon-Acetural in verschieden hohen Konzentrationen

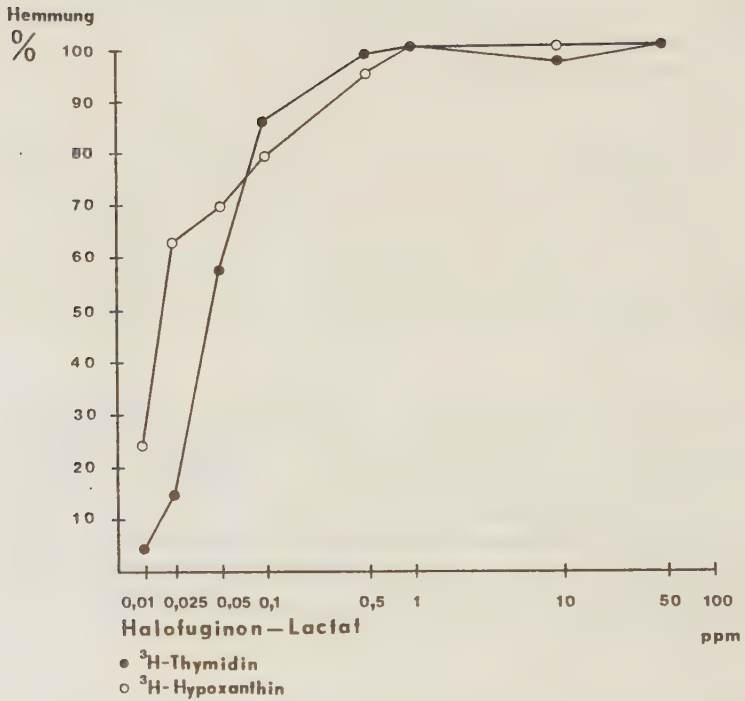
3.2.3 Halofuginon-Lactat

Die Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen betrug 95%. Bei Zusätzen zwischen 50 ppm und 1 ppm Halofuginon-Lactat überlebte keine Zelle die Behandlung, während 45,5% der mit 0,5 ppm inkubierten Zellen sich als noch lebensfähig erwiesen. Bei Inkubation mit Halofuginon-Lactat in den Konzentrationen zwischen 0,1–0,01 ppm lag die Lebensfähigkeit im Bereich der unbehandelten Kontrollzellen (siehe Tabelle 3).

Das Zellwachstum der mit einem Zusatz von 50–0,5 ppm Halofuginon-Lactat behandelten Zellen blieb in jedem Fall unter dem Ausgangswert von 5×10^5 Zellen/ml. Bei Konzentrationen von 0,1 ppm und weniger war zwar Zellwachstum nachweisbar, das jedoch in jedem Fall geringer als das der Kulturzellen ohne Zusatz blieb (siehe Tabelle 3). So betrug es bei Inkubation mit 0,1 ppm $9,9 \times 10^5$ und bei 0,01 ppm $15,7 \times 10^5$ Zellen/ml im Vergleich zu $18,5 \times 10^5$ Zellen/ml bei den unbehandelten Zellen.

Ebenso wie bei Halofuginon-Hydrobromid und -Acetat war die Ermittlung des Schizontenindex für alle mit Zusätzen von Halofuginon-Lactat in Konzentrationen von 50–0,5 ppm behandelten Zellen aufgrund der ausgeprägten Zellschädigung nicht möglich. Mit 0,5 ppm behandelte Zellen wuchsen im Vergleich zur Kontrolle spärlicher, überdurchschnittlich viele zeigten die bereits beschriebenen Zeichen von Zelldegeneration. Der bei den Kontrollen zwischen 82% und 84% liegende Schizontenindex wurde bei Inkubation mit 0,025 ppm auf 42% reduziert und stieg anschließend wieder auf 65% an (siehe Tabelle 3).

Die Hemmung des ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthineinbaus war bei allen Zusätzen von Halofuginon-Lactat in Konzentrationen zwischen 50 und 0,5 ppm nahezu vollständig (siehe Figur 3). Bei Inkubation mit 0,1–0,01 ppm wurde der ^3H -Thymidineinbau kontinuierlich bis auf 4% reduziert (siehe Figur 3). Die Hemmung des Einbaus von ^3H -Hypoxanthin verlief sich jedoch nicht analog. In den Konzentrationen von 0,05–0,01 ppm war sie mit 70%, 63% und 25% deutlich größer als die Hemmung des ^3H -Thymidineinbaus mit 58%, 15% und 4% (siehe Figur 3).



Figur 3

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-be-fallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Halofuginon- Lactat in verschieden hohen Konzentrationen

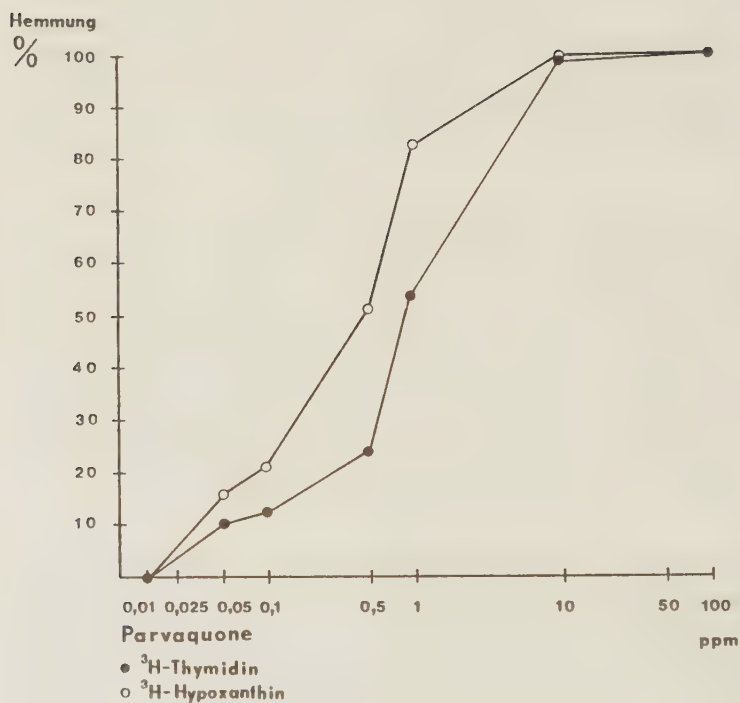
3.2.4 Parvaquone (993C)

In diesem Versuchsdurchgang lag die Lebensfähigkeit der unbehandelten Kulturzellen zwischen 94% und 96%. Bei Inkubation mit einem Zusatz von Parvaquone von 100 ppm im Nährmedium überlebten 10% der Zellen, während für eine Konzentration von 10 ppm eine Lebensfähigkeit von 72,5% ermittelt wurde. Bei allen Zusätzen von Parvaquone in Konzentrationen von 1–0,01 ppm erreichte die Lebensfähigkeit zwar nicht immer die der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen, lag jedoch nur um maximal 6% darunter (siehe Tabelle 4).

Das Zellwachstum der Zellen ohne Zusatz von Parvaquone betrug $17,6 \times 10^5$ Zellen/ml. Nach einer Behandlung mit 100 ppm Parvaquone erreichte es einen Wert $2,7 \times 10^5$ Zellen/ml, lag also deutlich unter dem Ausgangswert von 5×10^5 Zellen/ml. Bei mit 10 ppm inkubierten Zellen war keine Veränderung gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten, während bei Zusatz von den Konzentrationen 1 ppm und 0,5 ppm Zellproliferation stattgefunden hatte, die mit $11,9 \times 10^5$ bzw. $11,5 \times 10^5$ Zellen/ml allerdings unter dem von den unbehandelten Zellen erreichten Wert lag. Die Zellwachstumsrate der drei niedrigsten Konzentrationen (0,1–0,01 ppm) bewegte sich im Bereich der unbehandelten Kontrollzellen.

Die Untersuchung des Schizontenindex ergab Werte zwischen 83% und 85% für die unbehandelten Kulturzellen. Die mit 100 ppm und 10 ppm Parvaquone inkubierten Zellen zeigten Schädigungen wie bereits vorher für Halofuginon beschrieben, so daß eine sichere Auswertung nicht möglich war. Bei Zusatz von 1 ppm Parvaquone wurde der Schizontenindex auf 28% reduziert, in den Konzentrationen zwischen 0,5 ppm und 0,01 ppm stieg er kontinuierlich wieder bis 82% an (siehe Tabelle 4).

Einbau von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin war bei Zusatz der Konzentrationen 100 ppm und 10 ppm nicht oder kaum nachzuweisen. Bei Verdünnungsstufen von Parvaquone zwischen 1 ppm und 0,1 ppm verringerte sich die Hemmung des Einbaus der Nukleinsäurevorstufen kontinuierlich, bei ^3H -Thymidin von 54% auf 0, bei ^3H -Hypoxanthin von 82% auf 0. Beim Vergleich fiel die jeweils größere Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus gegenüber dem ^3H -Thymidineinbau auf (siehe Figur 4).



Figur 4

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Parvaquone in verschiedenen hohen Konzentrationen

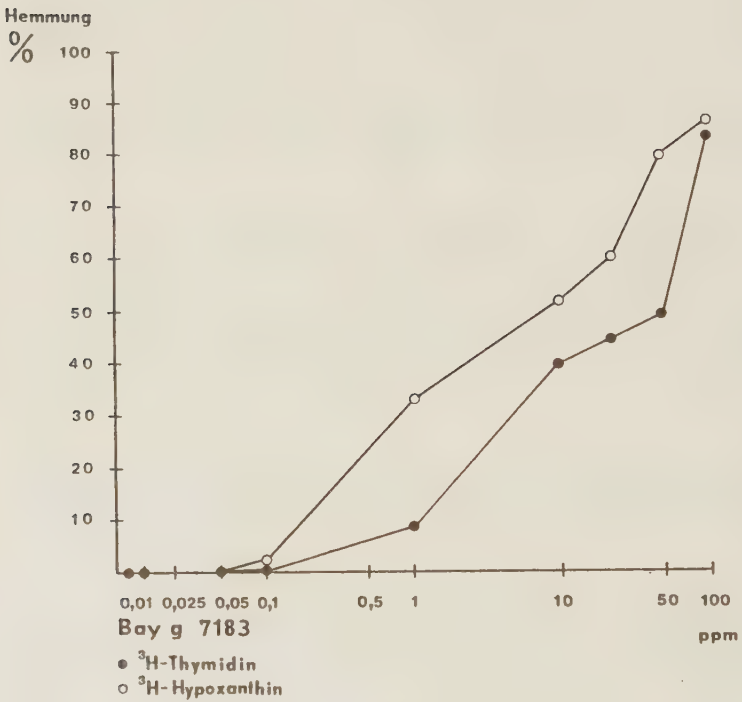
3.2.5 Bay g 7183

Die Untersuchung der Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen ergab Werte von 93% und 94%. Bay g 7183 in Konzentrationen zwischen 100 ppm und 25 ppm bewirkten eine Verminderung der Lebensfähigkeit auf Werte zwischen 71% und 76%. In Konzentrationen von 10 ppm und 1 ppm überlebten 82% bzw. 85% der Zellen. In niedrigeren Verdünnungsstufen von 0,1 ppm bis 0,005 ppm erreichte die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen die der Zellen ohne Zusatz von Bay g 7183.

Das Zellwachstum, das bei den unbehandelten Zellen auf $14,4 \times 10^5$ Zellen/ml anstieg, zeigte sich bei Zusatz von Konzentrationen von Bay g 7183 zwischen 100 ppm und 10 ppm gehemmt und erreichte Werte zwischen $4,9 \times 10^5$ und $10,4 \times 10^5$ Zellen/ml. Bei den nachfolgenden Konzentrationen zwischen 1 ppm und 0,005 ppm bewegte sich das Zellwachstum im Rahmen der Kontrollwerte (siehe Tabelle 5).

Der Schizontenindex nach Inkubation mit Bay g 7183 entsprach bei allen Konzentrationen der Befallsrate der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen (siehe Tabelle 5).

Dagegen erwies sich bei der Markierung mit radioaktiven Nukleinsäurevorstufen eine Hemmung sowohl der ^3H -Thymidin- wie auch der ^3H -Hypoxanthininkorporation. Bei Zusatz von Konzentrationen von Bay g 7183 zwischen 100 ppm und 0,1 ppm war eine kontinuierliche Abnahme der Hemmung der ^3H -Thymidineinbaurate von 83% auf 1% zu beobachten, während die Hemmung der ^3H -Hypoxanthininkorporation in diesen Konzentrationen von 86% auf 3% verringerte. Die Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus war dabei jeweils deutlicher ausgeprägt als die entsprechende des ^3H -Thymidins. Bei Konzentrationen unterhalb von 0,1 ppm war keine Hemmung des Einbaus der beiden Nukleinsäurevorstufen nachweisbar (siehe Figur 5).



Figur 5

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Bay g 7183 in verschieden hohen Konzentrationen

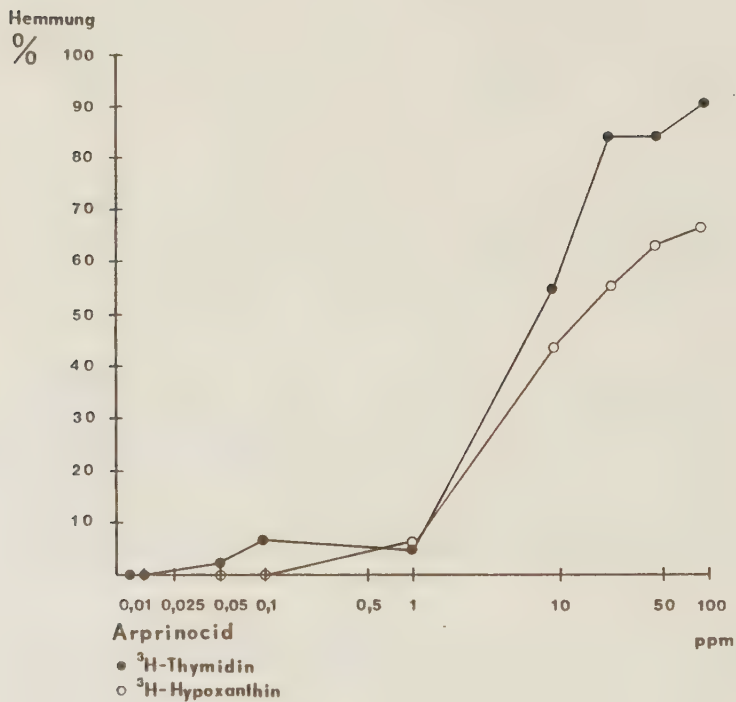
3.2.6 Arprinocid

Bei Zusatz von Arprinocid in Konzentrationen von 100 ppm bis 10 ppm zeigte sich gegenüber einer Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen von 93% und 94% eine reduzierte Überlebensrate, die zwischen 76% und 82% lag. Bei Inkubation mit Konzentrationen von 1-0,005 ppm Arprinocid entsprach die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen der der Kontrollzellen.

Das Zellwachstum erreichte bei den Zusätzen von Arprinocid in Konzentrationen zwischen 100 ppm und 10 ppm Werte zwischen $6,9 \times 10^5$ und $9,6 \times 10^5$ Zellen/ml im Vergleich zu $12,2 \times 10^5$ Zellen/ml der unbehandelten Kulturzellen. In den Konzentrationen zwischen 1 ppm und 0,005 ppm war das Zellwachstum der behandelten Zellen dem der unbehandelten vergleichbar (siehe Tabelle 6).

Der Schizontenindex wurde durch Inkubation mit Arprinocid nicht beeinflusst (siehe Tabelle 6). In den Konzentrationen 100 ppm und 50 ppm erwies sich das Wachstum im Vergleich zu den unbehandelten Zellen als weniger dicht. Bei Inkubation mit 100 ppm traten vermehrt Zelltrümmer und Zellen mit vakuolenhaltigem Zytoplasma auf, die lichtmikroskopisch nachweisbaren Zellstrukturen waren jedoch erhalten geblieben, so daß befallene und nicht befallene Zellen differenziert werden konnten.

Die Hemmung der ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthininkorporation war bis zu einem Zusatz von Arprinocid in einer Konzentration von 1 ppm vorhanden. Sie lag bei Inkubation mit 100 ppm für ^3H -Thymidin bei 89%, für ^3H -Hypoxanthin bei 68%, bei Inkubation mit 1 ppm dagegen nur bei 5% für ^3H -Thymidin und bei 6% für ^3H -Hypoxanthin. Unter denselben Bedingungen wurde der ^3H -Thymidineinbau jeweils deutlicher gehemmt als der ^3H -Hypoxanthineinbau (siehe Figur 6).



Figur 6

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-be-fallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Aprinocid in ver-schieden hohen Konzentrationen

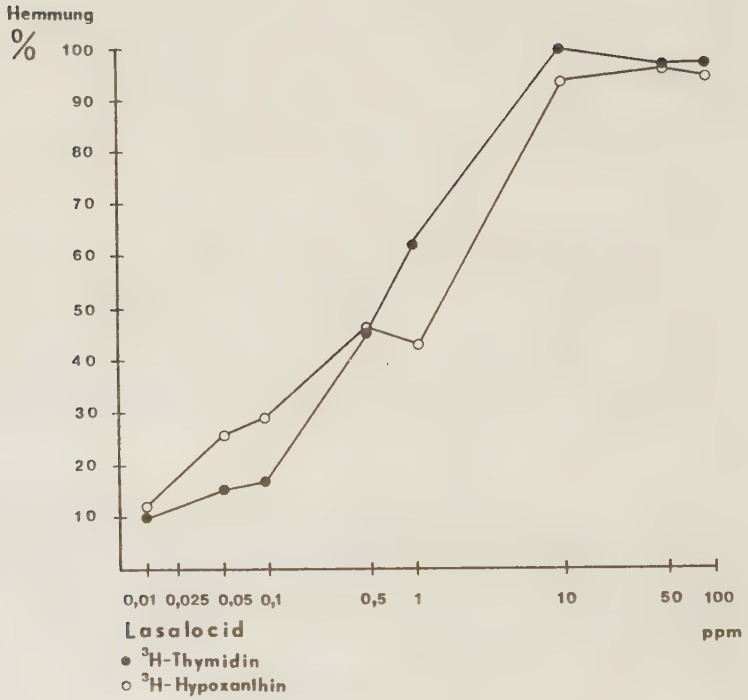
3.2.7 Lasalocid

Gegenüber einer Lebensfähigkeit der unbehandelten Kulturzellen von 92% bis 95% war diese nach Inkubation mit einem Zusatz von 100 ppm bis 50 ppm Lasalocid deutlich reduziert. Es überlebten 5% bzw. 20% der Zellen. Die Überlebensrate bei den Zusätzen von 10 ppm und 1 ppm Lasalocid lag mit 78% bzw. 82% noch unterhalb der Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen. Inkubation in Konzentrationen zwischen 0,5 ppm und 0,01 ppm beeinflusste die Lebensfähigkeit der lymphoblastoiden Zellen nicht (siehe Tabelle 7).

Gegenüber dem Zellwachstum der Zellkulturen ohne Zusatz auf $16,6 \times 10^5$ Zellen/ml war das nach Zusätzen von 100 ppm bis 1 ppm Lasalocid festgestellte Zellwachstum mit Werten zwischen $2,1 \times 10^5$ und $9,1 \times 10^5$ Zellen/ml vermindert oder erreichte bei 100 ppm und 50 ppm mit $2,1 \times 10^5$ bzw. $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml nicht einmal den Ausgangswert von 5×10^5 Zellen/ml. Die Zusätze von Lasalocid zwischen 0,5 ppm und 0,01 ppm beeinflussten das Zellwachstum nicht (siehe Tabelle 7).

Nach Inkubation mit Lasalocid in Konzentrationen zwischen 100 ppm und 10 ppm war die Ermittlung des Schizontenindex nicht möglich, da sich auf dem Deckglas nur Zelltrümmer befanden. Deutliche Degenerationserscheinungen, wie bereits vorher beschrieben, traten bei den mit 10 ppm inkubierten Zellen auf. Bei den auswertbaren Zellanfärbungen unterschied sich der Schizontenindex der behandelten Zellen nicht von dem der unbehandelten.

Die Hemmung des ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthineinbaus war bei Zusatz von Konzentrationen von 100 ppm bis 10 ppm Lasalocid mit Werten zwischen 96% und 99% nahezu vollständig. Bei den Konzentrationen zwischen 1 ppm und 0,01 ppm reduzierte sich die Hemmung von 61% bei 1 ppm auf 10% bei 0,01 ppm für den ^3H -Thymidineinbau. Die Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus betrug bei einer Konzentration von 1 ppm 43% und verminderte sich bei 0,01 ppm bis auf 12% (siehe Tabelle 7). Eine grundsätzlich ausgeprägtere Hemmung für den Einbau eines der beiden Nukleinsäurevorstufen konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Figur 7).



Figur 7

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Lasalocid in verschieden hohen Konzentrationen

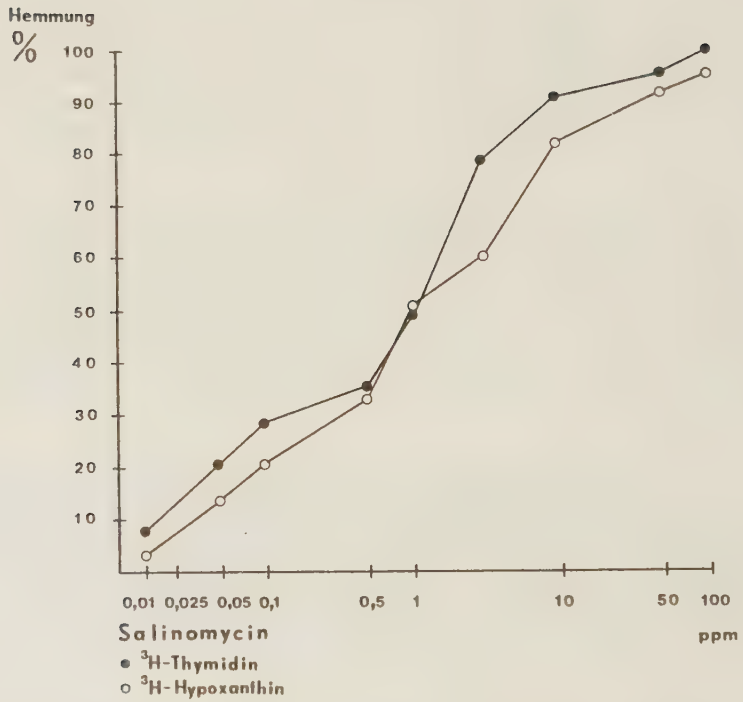
3.2.8 Salinomycin

Gegenüber der Lebensfähigkeit der unbehandelten lymphoblastoiden Zellen zwischen 91% und 94% überlebten bei Zusatz der höchsten Konzentrationen 100 ppm und 50 ppm Salinomycin keine bzw. nur 5% der Zellen die Behandlung. Auch Konzentrationen zwischen 10 ppm und 0,5 ppm bewirkten eine Reduktion der Lebensfähigkeit auf Werte zwischen 76% und 87%. Erst bei Inkubation der Zellen mit den drei niedrigsten Konzentrationen 0,1 ppm, 0,05 ppm und 0,01 ppm war deren Lebensfähigkeit der Zellen ohne Zusatz vergleichbar (siehe Tabelle 8).

Das Zellwachstum, das bei den unbehandelten Zellen 16×10^5 Zellen/ml erreichte, blieb bei mit 100 ppm und 50 ppm inkubierten Zellen mit $1,3 \times 10^5$ bzw. $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml noch unter dem Ausgangswert von 5×10^5 Zellen/ml. Bei Inkubation mit 10 ppm Salinomycin zeigte es einen Anstieg auf $6,2 \times 10^5$ Zellen/ml, bei 5 ppm auf 8×10^5 Zellen/ml. Bei Zusätzen in Konzentrationen zwischen 1 ppm und 0,01 ppm bewegte sich das Zellwachstum im Rahmen der unbehandelten Kontrollzellen (siehe Tabelle 8).

Die Werte für den Schizontenindex konnten wegen der Zellzerstörung bei Inkubation mit Konzentrationen von Salinomycin zwischen 100 ppm und 10 ppm nicht ermittelt werden. Eine geringe, vermutlich unspezifische Reduktion gegenüber dem Kontrollwert auf 78% zeigte der Schizontenindex bei einer Konzentration von 1 ppm. Für die Konzentrationen von 0,5 ppm bis 0,01 ppm bewegte er sich im Rahmen der unbehandelten Kulturzellen (siehe Tabelle 8).

Der ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthineinbau zeigte bei Zusatz von Salinomycin in den Konzentrationen 100 ppm und 50 ppm eine annähernd vollständige Hemmung. In den Konzentrationen zwischen 10 ppm und 0,01 ppm verminderte sich die Hemmung der ^3H -Thymidineinbaurate kontinuierlich von 90% auf 7%, die der ^3H -Hypoxanthineinbaurate von 82% auf 4% (Einzelheiten siehe Tabelle 8, Figur 8). Ein Unterschied im Einbau der beiden Nukleinsäurevorstufen konnte nicht nachgewiesen werden.



Figur 8

Hemmung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin in *T. annulata*-befallene lymphoblastoide Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Salinomycin in verschiedenen hohen Konzentrationen

Konzentration in ppm	Lebensfähigkeit in %			Gesamtzellzahl/ml $\times 10^5$			Schizontenindex in %				Hemmung von ^3H -Thymidin in %			Hemmung von ^3H -Hypoxant. in %				
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
-	96 (95-96)	94	95 (94-95)	8,7 (8,5-9,0)	14 (13-14)	16 (15-16)		83 (80-85)	83 (82-84)	83 (81-84)								
50	6,0 (5,0-6,5)	4,5 (4,0-5,0)	3,0 (2,0-4,0)	2,6 (2,1-3,0)	1,8 (1,7-1,9)	2,2 (1,8-2,5)					98 (96-99)	99 (99-100)	100 (87-89)	88 (96-97)	97 (96-99)	98 (96-99)		
10	6,5 (6,0-7,0)	6,0	4,5 (4,0-5,0)	3,1 (2,4-3,8)	2,0 (1,9-2,3)	2,3 (1,8-2,7)					97 (96-98)	99	86 (85-86)	96 (95-97)	98 (97-98)	98 (97-98)		
1	24 (22-25)	19 (18-20)	19 (18-20)	4,2 (4,0-4,5)	2,4 (2,3-2,4)	2,3					95 (94-96)	99 (98-100)	90 (89-90)	93 (92-94)	93 (91-95)	93 (91-95)		
0,5	55 (52-57)	43 (42-44)	40 (39-40)	4,5 (4,3-4,7)	3,3 (2,7-4,0)	2,7 (2,3-3,0)					95 (94-96)	99 (97-100)	71 (70-72)	84 (80-88)	93 (91-95)	93 (91-95)		
0,1	82 (80-83)	84 (83-85)	89 (88-90)	5,5 (5,4-5,7)	8,0 (7,9-8,1)	8,6 (8,5-8,8)		74 (72-76)	66 (65-67)	70 (70-71)	59 (57-60)	69 (68-70)	65 (77-80)	80 (78-82)	81 (80-82)	81 (80-82)		
0,05	94 (93-95)	94 (93-95)	93 (92-93)	6,3 (6,2-6,4)	12 (12-13)	13 (12-13)		72 (72-73)	59 (58-61)	70 (67-71)	46 (43-48)	56 (54-58)	49 (47-51)	69 (68-70)	75 (74-75)	75 (74-75)		
0,025	94 (93-94)	95	95	9,5 (8,5-10)	14 (13-14)	15 (14-15)		62 (61-63)	54 (53-55)	60 (59-61)	31 (29-32)	36 (33-38)	54 (52-56)	61 (59-63)	67 (65-69)	67 (65-69)		
0,01	95 (94-95)	94	94 (93-95)	9,3 (8,5-10)	13 (12-14)	15 (14-15)		72 (71-73)	68 (67-69)	70 (69-71)	23 (21-25)	28 (25-30)	25 (24-25)	20 (20-24)	14 (16-20)	14 (16-20)		

Tabelle 1: Einfluß von Halofuginon-Hydrobromid in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-infizierte lymphoblastoide Zellen *in vitro*.

Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3-4 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern darunter wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben. Bei übereinstimmenden Einzelwerten fehlt die Bereichsangabe.

Konzentrations- in ppm	Lebensfähigkeit in %			Gesamtzellzahl/ml x 10 ⁵			Schizontenindex in %			Hemmung von 3H-Thymidin in %		Hemmung von 3H-Hypoxant in %	
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	24 h	48 h
-	94 (92-96)	96 (95-96)	95 (93-96)	8,9 (8,5-9,3)	12 (16-18)	17 (16-18)	82 (82-83)	84 (83-84)	83 (82-83)				
50	1,0	0	0	3,3 (2,8-3,7)	2,0	1,5 (1,4-1,5)				95 (94-95)	98 (97-99)	96 (95-96)	98 (97-98)
10	2,0 (1,0-2,0)	1,0 (0-2,0)	0	3,6 (3,5-3,7)	1,9 (1,8-2,0)	1,3 (1,2-1,5)				95 (92-97)	100 (99-100)	97 (96-98)	98 (97-99)
1	4,0 (3,0-5,0)	2,0 (0-4,0)	0	2,9 (2,8-3,0)	2,7 (2,3-2,9)	1,7 (1,6-1,7)				96 (99-100)	99 (98-100)	90 (88-92)	95 (94-96)
0,5	4,1 (3,9-4,3)	4,5 (4,3-4,6)	47 (46-47)	4,6 (4,3-4,9)	2,4 (2,3-2,4)	1,9 (1,8-2,0)				97	100 (99-100)	80 (78-82)	92 (95-96)
0,1	92 (90-96)	93 (90-96)	91 (89-93)	6,7 (6,5-6,9)	8,9 (8,8-9,0)	10 (9,8-11)	74 (73-75)	70 (69-71)	65 (64-67)	86 (85-87)	83 (82-84)	79 (79-80)	79 (75-81)
0,05	93 (92-93)	92 (91-92)	94 (92-96)	6,7 (6,1-7,4)	11 (12-13)	12 (12-13)	74 (72-76)	68 (65-70)	60 (59-61)	73 (70-76)	72 (70-74)	62 (60-63)	64 (59-69)
0,025	94 (92-95)	93 (91-95)	95 (93-96)	9,1 (7,8-10)	12 (11-12)	15 (13-17)	62 (59-65)	54 (54-55)	50 (49-53)	54 (53-56)	51 (49-53)	65 (64-67)	71 (69-74)
0,01	94 (93-94)	94 (92-96)	95 (94-95)	8,3 (6,9-9,8)	12 (11-13)	17 (15-19)	79 (78-80)	74 (72-76)	70 (68-71)	10 (9-12)	14 (12-17)	15 (11-17)	18 (17-20)

Tabelle 2: Einfluß von Halofuginon-Aceturat in verschiedenen hohen Konzentrationen auf Theileria annulata-infizierte lymphoblastoide Zellen in vitro
Siehe auch Legende zur Tabelle 1

Konzentrations- tration in ppm	Lebensfähigkeit in %		Gesamtzellzahl/ml × 10 ⁵		Schizontenindex in %		Hemmung von 3H-Thymidin in %		Hemmung von 3H-Hypoxant in %		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h
-	95 (94-96)	95 (94-97)	9,1 (12-13)	12 (18-19)	82 (80-84)	84 (82-85)	82 (80-82)				
50	0 (0-2,0)	1,0 (0-2,0)	3,8 (3,7-4,0)	2,9 (2,5-3,2)	3,0 (2,3-3,8)			99	100	98 (97-98)	100 (99-100)
10	0	0	4,2 (3,8-6,4)	2,9 (2,8-3,0)	3,7 (2,4-4,4)			99 (98-99)	98 (98-100)	98 (97-98)	100 (99-100)
1	5,0 (3,0-7,0)	1,0 (0-2,0)	4,8 (3,0-3,5)	3,3 (4,0-4,6)	4,3 (4,0-4,6)			99 (98-99)	100 (99-100)	96 (94-97)	100 (99-100)
0,5	68 (65-70)	55 (51-57)	4,9 (4,7-5,1)	3,6 (3,2-3,9)	3,6 (3,0-4,2)			98 (97-99)	99 (98-99)	93 (89-97)	96 (94-98)
0,1	93 (92-93)	94 (93-94)	7,8 (7,7-7,8)	8,8 (8,7-8,8)	9,9 (9,5-10)	58 (56-59)	56 (55-57)	77 (76-78)	86 (85-86)	77 (75-78)	75 (69-80)
0,05	94 (93-94)	95 (94-95)	7,4 (7,3-7,5)	9,8 (9,4-10)	13 (11-16)	56 (52-59)	46 (45-48)	55 (53-56)	58 (56-60)	71 (68-73)	70 (68-71)
0,025	95 (92-96)	93 (92-95)	8,4 (8,0-12)	10 (12-14)	13 (57-63)	51 (49-52)	42 (40-44)	9,0 (8,0-10)	12 (13-16)	60 (58-61)	64 (63-67)
0,01	97 (95-98)	94 (93-94)	8,9 (7,8-10)	13 (14-17)	16 (71-75)	72 (69-74)	65 (63-69)	1,0 (0-2,0)	4,0 (3,0-4,0)	13 (11-14)	25 (22-27)

Tabelle 3: Einfluß von Halofuginon-Lactat in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-infizierte lymphoblastoide Zellen in vitro
Siehe auch Legende zur Tabelle 1

Konzentrations- in ppm	Lebensfähigkeit in %			Gesamtzellzahl/ml $\times 10^5$			Schizontenindex in %			Hemmung von ^3H -Thymidin in %			Hemmung von ^3H -Hyoxant in %		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
-	96 (95-97)	94	95	8,5 (8,4-8,6)	12	18 (17-18)	83 (82-84)	84 (83-84)	85						
100	55 (53-56)	29 (27-30)	10 (9,0-11)	3,9 (3,8-4,0)	3,2 (2,7-3,7)	2,7 (2,6-2,9)				100 (99-100)	100	100	98 (97-99)	99 (97-100)	100
10	85 (83-86)	81 (80-82)	73 (72-73)	4,7 (4,6-4,8)	8,6 (8,5-8,8)	5 (4,8-5,3)				98 (97-100)	99 (98-99)	99 (98-100)	99 (98-100)	99 (98-100)	100 (99-100)
1	92 (91-92)	93	89 (88-90)	5,7 (5,6-5,8)	9,5 (9,3-9,6)	12 (9,3-9,6)	32 (30-33)	31 (29-32)	28 (27-29)	49 (48-51)	55 (50-57)	54 (51-56)	70 (68-72)	76 (75-77)	82 (79-85)
0,5	89 (87-89)	88 (87-89)	90 (89-90)	6,7 (6,6-6,8)	9,6 (9,5-9,7)	12 (10-13)	42 (41-42)	40 (38-39)	39 (38-39)	22 (19-25)	23 (19-26)	24 (19-27)	41 (38-43)	46 (44-48)	52 (50-54)
0,1	91 (90-91)	93	95 (94-95)	7,1 (7,0-7,2)	14 (13-14)	21 (20-21)	60 (58-62)	66 (64-68)	64 (63-65)	8,0 (7,0-10)	10 (8,0-12)	12 (8,0-13)	13 (10-15)	16 (12-20)	22 (20-23)
0,05	93 (92-94)	94 (92-95)	95 (93-97)	8,3 (8,2-8,5)	14 (14-15)	16 (14-16)	70 (68-72)	72 (70-74)	77 (75-78)	8,0 (7,0-10)	10 (9,0-12)	10 (8,0-11)	10 (7,0-12)	13 (12-15)	16 (15-17)
0,01	94 (93-94)	95	94 (93-95)	7,3 (6,8-7,8)	13 (12-13)	18 (18-19)	80 (78-81)	82 (80-84)	82 (81-82)	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4: Einfluß von Parvaquone in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-Infizierte lymphoblastoide Zellen in vitro
Siehe auch Legende zur Tabelle 1.

Konzentration in ppm	Lebensfähigkeit in %			Gesamtzellzahl/ml x 10 ⁵			Schizontenindex in %			Hemmung von 3-H-Thymidin in %		Hemmung von 3-H-Hypoxanthin in %	
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	24 h	48 h
-	93 (92-93)	94 (93-96)	94 (92-95)	6,7 (5,4-8,0)	11 (9,6-12)	14 (14-15)	89 (87-92)	86 (84-91)	87 (84-92)				
100	80 (78-82)	79 (77-80)	71 (69-73)	3,1 (2,8-3,5)	3,7 (2,7-4,7)	4,9 (4,7-5,2)	89 (87-92)	90 (87-93)	90 (85-92)	44 (40-48)	58 (53-66)	57 (51-63)	67 (60-75)
50	84 (82-85)	80 (79-81)	75 (71-78)	3,9 (3,4-4,4)	3,2 (4,1-4,4)	4,3 (4,1-4,4)	88 (84-93)	88 (85-93)	89 (87-94)	34 (31-38)	35 (27-40)	52 (44-58)	62 (57-68)
25	82 (80-85)	78 (75-82)	76 (72-79)	5,3 (4,9-6,9)	5,7 (5,5-5,8)	6,9 (6,1-7,3)	90 (88-94)	87 (82-94)	86 (84-90)	23 (17-27)	36 (31-39)	42 (36-49)	48 (42-55)
10	86 (84-88)	85 (83-88)	82 (79-85)	5,6 (4,0-7,2)	9,0 (8,4-9,7)	10 (6,1-7,3)	87 (83-92)	86 (81-92)	86 (82-93)	28 (24-32)	32 (28-38)	16 (10-19)	32 (27-38)
1	94 (93-94)	89 (86-91)	85 (82-88)	6,7 (5,8-7,7)	9,3 (8,0-10)	13 (12-13)	88 (86-93)	86 (82-93)	87 (83-91)	4,0 (2,0-7,0)	5,0 (3,0-6,0)	19 (15-24)	26 (25-27)
0,1	93 (92-94)	92 (91-93)	92 (90-92)	6,5 (4,8-8,2)	10 (8,2-12)	14 (12-15)	88 (84-93)	87 (83-94)	87 (82-90)	1,0 (0-1,0)	0 (0-4,0)	0 (0-4,0)	3,0 (3,0-7,0)
0,05	93 (92-93)	94 (93-96)	91 (90-92)	7,6 (5,1-10)	9,9 (7,6-12)	14 (13-14)	90 (87-94)	86 (82-92)	89 (86-92)	0 (0-94)	0 (84-94)	0 (0-94)	0 (0-94)
0,01	94 (93-96)	92 (90-94)	94 (92-95)	7,1 (5,5-8,8)	10 (8,3-13)	14 (12-15)	88 (85-92)	86 (84-91)	90 (88-94)	0 (0-94)	0 (84-94)	0 (0-94)	0 (0-94)
0,005	93 (92-94)	92 (90-93)	94 (93-94)	6,3 (4,7-8,0)	10 (7,9-14)	14 (13-15)	88 (85-92)	86 (84-91)	88 (84-92)	0 (0-94)	0 (84-94)	0 (0-94)	0 (0-94)

Tabelle 5: Einfluß von Bay g 7183 in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-infizierte lymphoblastoiden Zellen in vitro
Siehe auch Legende zur Tabelle 1.

Konzentration in ppm	Lebensfähigkeit in %			Gesamtzellzahl/ml x 10 ⁵			Schizontenindex in %			Hemmung von 3H-Thymidin in %			Hemmung von 3H-Hypoxant in %		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
-	94 (93-94)	93 (92-93)	94 (93-94)	6,6 (5,6-7,5)	10 (9,3-11)	14 (14-15)	87 (85-88)	83 (82-84)	85 (84-85)						
100	87 (85-89)	84 (82-85)	76 (73-79)	4,2 (3,7-4,8)	2,9 (2,9-3,0)	6,9 (5,4-8,4)	86 (85-87)	83 (81-84)	86	55 (54-56)	63 (60-66)	89 (86-92)	58 (56-60)	60 (58-61)	68 (64-71)
50	89 (87-90)	84 (82-85)	78 (77-79)	4,1 (4,0-4,3)	5,7 (5,0-6,3)	7,3 (6,7-7,9)	82 (80-83)	82 (80-84)	85 (84-85)	54 (53-54)	60 (59-60)	83 (80-86)	51 (50-51)	61 (60-62)	64 (58-70)
25	92 (89-95)	85 (84-86)	81 (80-82)	5,7 (4,2-7,2)	7,2 (6,6-7,8)	9,4 (8,9-9,9)	83 (80-86)	83 (80-85)	83 (82-83)	43 (39-47)	53 (51-55)	83	41 (39-43)	50 (46-54)	55 (54-56)
10	91 (90-91)	89 (87-92)	82 (80-83)	6,4 (4,6-8,2)	7,2 (7,1-7,4)	9,6 (9,5-9,8)	82 (81-83)	81 (78-84)	83 (82-83)	37 (34-40)	40 (52-57)	55	34 (33-35)	39 (38-40)	44 (41-46)
1	93 (92-93)	93 (91-94)	93 (92-93)	7,3 (5,3-9,2)	9,7 (9,6-9,9)	14 (13-14)	82 (80-83)	83 (82-84)	84 (82-86)	4,0 (3,0-4,0)	7,0 (6,0-8,0)	5,0	11 (9,0-13)	11 (10-12)	6,0 (4,0-7,0)
0,1	93 (93-94)	92 (92-93)	93 (91-94)	6,9 (5,5-8,4)	9,8 (9,4-10)	13 (12-14)	84	83 (81-84)	86 (85-87)	3,0 (2,0-4,0)	5,0 (4,0-5,0)	6,0 (4,0-7,0)	0	0	0
0,05	92 (91-93)	92 (91-94)	93 (91-94)	6,8 (4,9-8,7)	11 (8,8-13)	14 (14-15)	80 (79-81)	84 (81-86)	85	0	0	2,0 (1,0-2,0)	0	0	0
0,01	92 (90-94)	92 (91-94)	94 (91-94)	7,2 (6,0-8,5)	11 (9,5-12)	13 (11-15)	82 (81-82)	83 (82-84)	84 (82-85)	2,0 (1,0-3,0)	1,0 (0-2,0)	0	0	0	0
0,005	92 (90-94)	95 (94-96)	95 (94-96)	7,5 (5,3-9,8)	11 (9,7-13)	14 (12-15)	82 (81-83)	82 (80-83)	86 (85-87)	0	0	0	0	0	0

Tabelle 6: Einfluß von Aprinocid in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-infizierte lymphoblastoide Zellen in vitro
Siehe auch Legende zur Tabelle 1.

Konzentration in ppm	Lebensfähigkeit in %		Gesamtzellzahl/ml $\times 10^5$		Schizontenindex in %		Hemmung von ^3H -Thymidin in %		Hemmung von ^3H -Hydroxant. in %	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
-	93 (93-94)	95 (91-92)	8,2 (7,1-9,4)	15	84 (82-85)	82 (79-84)				
100	21 (20-22)	12 (11-13)	1,9 (1,7-2,1)	1,4 (1,2-1,6)			99 (98-99)	96 (94-97)	92 (90-94)	93 (91-94)
50	59 (55-62)	30 (17-23)	3,5 (3,0-3,9)	1,8 (1,4-2,3)			95 (94-96)	96 (94-97)	88 (86-90)	95 (94-95)
10	85 (82-89)	78 (73-82)	6,3 (5,8-6,9)	10 (9,8-11)			91 (87-94)	97 (94-99)	46 (43-48)	92 (80-89)
1	92 (90-94)	86 (85-87)	7,5 (7,2-7,7)	12 (11-12)	85 (84-85)	83	27 (24-29)	37 (35-38)	13 (12-14)	39 (35-43)
0,5	92 (90-94)	90 (89-91)	8,1 (7,6-8,0)	12 (11-12)	82 (81-83)	81 (79-82)	11 (8,0-12)	17 (15-20)	19 (16-23)	46 (43-49)
0,1	93 (90-92)	91 (89-91)	7,8 (7,6-8,0)	13 (12-13)	83 (82-83)	84 (84-85)	11 (8,0-12)	11 (6,0-16)	11 (9,0-13)	17 (11-23)
0,05	92 (91-93)	93 (91-94)	8,9 (7,6-10)	13 (12-13)	84 (82-85)	84 (83-84)	10 (8,0-12)	10 (8,0-12)	13 (11-15)	20 (17-22)
0,01	91 (90-92)	95 (93-95)	9,4 (7,5-11)	15 (14-15)	83 (82-84)	81 (79-82)	4,0 (2,0-7,0)	12 (10-13)	8,0 (6,0-11)	12 (5,0-9,0)

Tabelle 7: Einfluß von Lasalocid in verschiedenen hohen Konzentrationen auf *Theileria annulata*-infizierte lymphoblastoide Zellen in vitro.
Siehe auch Legende zur Tabelle 1.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Für die Beurteilung der Einwirkung eines Medikamentes auf die obligat intrazellulären Entwicklungsstadien von *Theileria annulata* kann das Verhalten der Schizonten nicht isoliert von dem der befallenen lymphoblastoiden Wirtszelle betrachtet werden. Wird die letztere durch ein Chemotherapeutikum abgetötet, so folgt daraus zwangsläufig das Absterben der Schizonten. Die chemotherapeutische Behandlung muß aber in der optimalen Dosierung selektiv nur den Parasiten eliminieren, ohne die Wirtszelle zu schädigen.

Zur Ermittlung der Toxizität der verwendeten Chemotherapeutika auf die Kulturzellen diente die Prüfung der Lebensfähigkeit durch Anfärbung mit Trypanblau und die in der NEUBAUER-Zählkammer ermittelte Zellvermehrung. Durch Anfärbung mit Trypanblau wurde der Prozentsatz der irreversibel geschädigten lymphoblastoiden Zellen festgestellt. Die Auszählung der Zellzahl pro ml Zellsuspension zeigte im Vergleich zur Ausgangskonzentration und zur unbehandelten Kontrolle in bestimmten Konzentrationen eine Wachstumshemmung. Vergleichbar sind jedoch nur die Werte der jeweiligen Versuchsreihe untereinander, da das Zellwachstum auch der unbehandelten Zellen bei den einzelnen Versuchsdurchgängen variierte. Nach 72 Stunden Inkubation erreichten die Kulturzellen ohne Zusatz eines Chemotherapeutikums Werte zwischen $12,2 \times 10^5$ und $18,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Zellsuspension.

Die Phase der größten Zellvermehrung lag meist zwischen 24 und 48 Stunden, nur in 2 Serien zwischen 48 und 72 Stunden Inkubation. Für einen möglichst konstanten Verlauf der Zellwachstumskurve ist offensichtlich zusätzlich von Bedeutung, in welcher Phase des Wachstums die zu behandelnden Zellen aus der Stammkultur gewonnen werden. Das Zellwachstum in einer *Theileria annulata*-Zellkultur erfolgt nach Aussaat und einer mehrere Stunden dauernden Verzögerungsphase, in der die Zellen sedimentieren, in Form einer sog. Sättigungskurve. Die anfänglich logarithmische Vermehrung nimmt mit ungünstiger werdenden Bedingungen wie Nährstoff- und Raummangel mehr und mehr ab und erreicht einen Grenzwert, an dem die Zelldichte vermutlich durch eine Art negativer Rückkopplung reguliert wird (PAUL, 1980). Abhängig davon, ob die Zellen noch in der Vermehrungs- oder schon in der Ruhephase gewonnen werden, setzt nach erneuter Aussaat das Wachstum früher oder später ein. Da für die Experimente die Zellen zwischen dem 3. und dem 5. Tag nach der letzten Passage und Mediumwechsel gewonnen wurden, mag der Zeitpunkt der Gewinnung der Grund für den unterschiedlichen Verlauf der Wachstumskurve sein.

Die lichtmikroskopische Betrachtung der behandelten, GIEMSA-gefärbten Kulturzellen erlaubte in gewissem Maße Rückschlüsse auf die Toxizität der verwendeten Chemotherapeutika, da es bei deutlicher Überdosierung neben den beschriebenen Zelldegenerationerscheinungen zur Ablösung des Zellrasens vom Untergrund kam, so daß nach Fixierung und Färbung keine oder nur wenige Zellen auf dem Deckgläschen erhalten blieben. Die sehr geringe Anzahl der Zellen, zumal wenn sie zusätzlich noch pathologische Veränderungen zeigten, ermöglichten in bestimmten Konzentrationen keine sichere Bestimmung des Schizontenindex.

Beim Vergleich der beiden Methoden zur Ermittlung des Zellwachstums - Zählung in der Zählkammer und Markierung mit ^3H -Thymidin und ^3H -Hypoxanthin - erwies sich letztere Methode als sensibler. Dies beinhaltet allerdings auch eine größere Empfindlichkeit gegenüber Fehlern, z.B. beim Einpipettieren der Zellen und der ^3H -Thymidin- und ^3H -Hypoxanthinlösung in die Mikrotiterplatten und beim Absaugen mit dem Zellsammler.

Halofuginon kam als Hydrobromid, Acetat und Lactat zur Anwendung, um eventuelle Unterschiede in der Wirkung der drei Salze festzustellen. Bei der Prüfung der Lebensfähigkeit durch Anfärbung mit Trypanblau erwiesen sich übereinstimmend die Konzentrationen 0,5 bis 50 ppm als zu toxisch. Bei 0,5 ppm überlebte nicht einmal die Hälfte der Zellen. Bis zu dieser Konzentration hatte nicht nur kein Zellwachstum stattgefunden, sondern ein Teil der lymphoblastoiden Zellen muß abgestorben sein, da bei allen drei Salzen nicht einmal die Ausgangskonzentrationen erreicht wurden. In den stark toxisch wirkenden Konzentrationen zwischen 0,5 und 50 ppm war auch der Schizontenindex nicht mehr zu ermitteln, so daß diese Konzentrationen als eindeutig überdosiert anzusprechen sind.

Der Schizontenindex erreichte die niedrigsten Werte bei 0,025 ppm der drei Halofuginon-Salze, höhere Konzentrationen bewirkten eine weniger deutliche Reduktion der Schizonten. Dieses Phänomen ließe sich nur bei genauer Kenntnis der Wirkungsweise des Halofuginon erklären, über die noch teilweise Unklarheit besteht. MEHLHORN et al. (1981) schließen aus elektronenoptischen Beobachtungen an durch Biopsie gewonnenen *Theileria parva*-Schizonten, daß Halofuginon primär infizierte lymphoblastoide Zellen zerstört und die so freigesetzten Schizonten aufgrund ihres Unvermögens, außerhalb der Wirtszelle zu überleben, zugrunde gehen.

Nichtinfizierte Lymphozyten dagegen werden im Tierversuch bei der verwendeten Dosis von 1-2 mg/kg KG nicht beeinflusst. Auf die Kultur übertragen, müßte der ansteigende Prozentsatz der nichtinfizierten Zellen allein auf die Vermehrung der schon ausgangs vorhandenen nichtinfizierten lymphoblastoiden Zellen zurückzuführen sein, während die *Theileria annulata*-Schizonten enthaltenden Zellen weitgehend zerstört worden sind. Die bisher aufgrund der Ergebnisse von HULLIGER et al. (1964) und MALMQUIST et al. (1970) vertretene Meinung, daß allein der Befall mit *Theileria*-Schizonten die jeweilige Wirtszelle zur Zellteilung anregt, müßte daraufhin korrigiert werden.

UILENBERG et al. (1980) untersuchten den Einfluß von Halofuginon-Hydrobromid auf verschiedene *Theileria parva*-Stämme *in vitro* und bemerkten ebenfalls eine deutliche Reduktion des Prozentsatzes der infizierten Zellen, wobei sich die einzelnen Stämme als stark unterschiedlich empfindlich gegenüber der Behandlung erwiesen. Es wurde lichtmikroskopisch eine Degeneration der Schizonten bis zur völligen Auflösung innerhalb der Wirtszellen beobachtet, die anschließend morphologisch wieder das Aussehen kleiner Lymphozyten annahmen. Zur Erklärung der größten Reduktion des Schizontenindex bei 0,025 ppm könnte eine Synthese der bestehenden Auffassungen dienen, daß bei einer Behandlung mit Konzentrationen oberhalb von 0,025 ppm die Zerstörung der Wirtszelle mit zwangsläufig anschließender Eliminierung der Schizonten in den Vordergrund treten könnte, was sich in einer Reduktion der Befallsrate weniger auswirkt. Obwohl nach Meinung von MEHLHORN et al. (1981) Halofuginon nichtinfizierte Lymphozyten zumindest *in vivo* nicht beeinflusst, wäre in der Kultur zusätzlich ein hemmender Einfluß auch auf nichtinfizierte lymphoblastoide Zellen denkbar. Bei der niedrigeren Konzentration von 0,025 ppm könnte die Wirkung des Halofuginon auf den Parasiten mehr spezifischer Art sein, so daß eine größere Anzahl Wirtszellen die Behandlung überleben. Auch eine geringere Proliferationshemmung der nichtinfizierten lymphoblastoiden Zellen könnte eine Rolle spielen. Beides bedeutete einen prozentualen Anstieg der nichtinfizierten lymphoblastoiden Zellen und damit eine Reduktion des Schizontenindex.

Die starke Abnahme der Gesamtzellzahl, die UILENBERG et al. (1980) bei *Theileria parva*-Infizierten lymphoblastoiden Zellen auch noch bei Konzentrationen von 0,01 und 0,005 ppm Halofuginon-Hydrobromid festgestellt hatten, konnte für *Theileria*

annulata bei Zusätzen von 0,025 und 0,01 ppm nicht bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der ^3H -Thymidineinbaurate zeigte sich allerdings bei den drei Salzen des Halofuginon eine unterschiedlich deutlich ausgeprägte Hemmung der Lymphoblastoidzellproliferation. Die Hemmung erreichte bei Halofuginon-Hydrobromid auch bei der niedrigsten verwendeten Konzentration Werte bis zu 28%, so daß dieses Salz in vitro auch in geringen Konzentrationen offensichtlich die größte Toxizität für die Wirtszelle besitzt. Die in Relation zur Vermehrung des Parasiten stehende Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus war bei Zusatz von 0,025 ppm Halofuginon-Aceturat am größten, wobei allerdings gleichzeitig die Hemmung der Wirtszellproliferation am deutlichsten ausgeprägt war. Dem Idealfall mit möglichst geringer Hemmung der Lymphoblastoidzellproliferation und möglichst hoher Hemmung der Schizontenvermehrung nähert sich Halofuginon-Lactat. Gleichzeitig bewirkt es auch die insgesamt größte Reduktion des Schizontenindex.

Wenn auch Halofuginon-Lactat von den drei Salzen am geeignetsten zu sein scheint, ist bei der Einschätzung der Wirkung in vitro allerdings zu berücksichtigen, daß die Löslichkeit und Verteilung der einzelnen Substanzen im Nährmedium eine wichtige Rolle spielen. Da die wasserlöslichen Salze Halofuginon-Aceturat und -Lactat vermutlich eine gleichmäßigere Verteilung aufwiesen, kann hierin der Grund für die höhere Effizienz in vitro liegen.

Von allen verwendeten Chemotherapeutika ergab das zur Gruppe der Naphtoquinone gehörende Parvaquone (993C) die besten Ergebnisse. Die von McHARDY (1979) beschriebene Aktivität gegen *Theileria parva* in vitro konnte auch für *Theileria annulata* bestätigt werden, wenngleich sich die Dosierung von 0,1 mg/l (entsprechend 0,1 ppm) als nicht völlig ausreichend erwies. Die größte Reduktion des Schizontenindex bei *Theileria annulata*-infizierten Zellen bewirkte eine Konzentration von 1 ppm, während er bei Zusätzen von 0,5 und 0,1 ppm wieder deutlich anstieg. Allerdings war noch bis zu einer Konzentration von 0,1 ppm eine deutliche Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus gegenüber dem ^3H -Thymidineinbau nachweisbar. Demnach wurden die *Theileria annulata*-Schizonten stärker beeinflusst als die lymphoblastoide Wirtszelle. Insgesamt scheinen jedoch in vitro kultivierte *Theileria annulata*-Schizonten gegenüber einer Behandlung mit Parvaquone weniger empfindlich als *Theileria parva*-Schizonten zu sein.

Wie bei Halofuginon ist auch bei Parvaquone die Wirkungsweise nicht sicher bekannt. In der aufgrund meiner Untersuchungen als optimal anzusehenden Konzentration von 1 ppm bewirkte Parvaquone allerdings eine Hemmung des Zellwachstums, die sowohl durch Zählung in der Zählkammer wie auch durch Messung der ^3H -Thymidineinbaurate festgestellt wurde.

Im Vergleich zu dem in vitro wirksamsten Halofuginon-Lactat erwies sich Parvaquone zwar als insgesamt weniger toxisch, jedoch erfordert es auch eine höhere Dosierung. In der optimalen Konzentration bewirkt das Menoctonderivat Parvaquone eine deutlich größere Hemmung der Wirtszellproliferation als Halofuginon-Lactat, was sowohl in der Zellvermehrungsrate wie auch anhand der ^3H -Thymidineinbaurate nachweisbar war.

Die Reduktion der Befallsrate (Schizontenindex) war bei Parvaquone mit einem Abfall auf 33% des Ausgangswertes deutlicher ausgeprägt als bei Halofuginon-Lactat mit einem Schizontenindex von 51% des Ausgangswertes. Insofern scheint Parvaquone eine selektivere, eher auf Eliminierung der Parasiten gerichtete Wirkung zu besitzen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Schizontenindex und der Hemmung der Einbaurate der Nukleinsäurevorstufen erwies sich 1 ppm als die günstigste Konzentration in vitro, trotz der auftretenden Proliferationshemmung der Lymphoblastoidzellen. Die Hemmung der Parasitenvermehrung war jedoch deutlich größer. Die nächstniedrigere Konzentration 0,5 ppm bewirkte zwar eine geringere ^3H -Thymidineinbauhemmung, die Hemmung der ^3H -Hypoxanthininkorporation lag jedoch ebenfalls deutlich unter dem Wert der mit 1 ppm behandelten Zellen.

Es stellt sich die Frage, was mit den parasitenfreien Lymphoblastoidzellen in der Kultur geschieht. McHARDY (1978) beobachtete, daß sich mit Menocton behandelte, ehemals *Theileria parva*-Schizonten enthaltende Lymphoblastoidzellen in ihrer Zellteilungsfähigkeit kaum von nicht befallenen Zellen unterscheiden, während nach Eliminierung von *Theileria annulata*-Schizonten die Zellproliferationsrate deutlich vermindert war. Dies spricht für eine unterschiedliche Mitogenität der beiden Parasiten. Die Vermutung einer Rückwandlung der behandelten Lymphoblastoidzellen in eine lymphozytäre Form mit Zellproliferation noch mehrere Tage nach Eliminierung der Parasiten wurde durch PINDER et al. (1981) bestätigt. Sie klassifizierten diese Zellen morphologisch als mittelgroße Lymphozyten und kleine lymphoblastoide Zellen. Für *Theileria annulata* sind diesbezüglich noch keine Untersuchungen bekannt.

Die übrigen vier verwendeten Chemotherapeutika gehören alle zur Gruppe der Kokzidiostatika, wobei sich Bay g 7183 in vivo wie in vitro durch seine geringe Toxizität auszeichnet. In Konzentrationen unterhalb von 1 ppm war keine Wirkung auf Schizonten und Lymphoblastoidzellen zu erkennen. Von 25–100 ppm war für die Wirtszelle ein deutlicher wachstumshemmender Effekt nachweisbar. Auch bei einer Behandlung mit 10 ppm lag nach 72 Stunden Inkubation der erreichte Wert 28% unter dem der unbehandelten Kontrollzellen. Im Vergleich zu Halofuginon oder Parvaquone zeigte sich in hoher Dosierung jedoch eine wesentlich geringere Hemmung der durch die ^3H -Thymidineinbaurate ermittelten Wirtszellproliferation. Die Hemmung der ^3H -Hypoxanthineinbaurate war in jedem Fall größer als die von ^3H -Thymidin, so daß eine selektive Wirkung auf die Schizonten vermutet werden kann. Der Schizontenindex dagegen zeigte nur geringe Schwankungen um den Mittelwert und konnte das Ergebnis nicht bestätigen. Der thellerioostatische Effekt von Bay g 7183 scheint die Vermehrung der Schizonten zu hemmen, aber keine Abtötung und Eliminierung der Parasiten zu bewirken. Für eine Wachstumshemmung spricht auch die Abnahme der Zellzahlen bei gleichzeitiger geringer Beeinflussung der Lebensfähigkeit.

Die drei übrigen verwendeten Kokzidiostatika Aprinocid, Lasalocid und Salinomycin ergaben in vitro keine Hinweise auf Aktivität gegen *Theileria annulata*-Schizonten. Die Befallsrate wurde durch keines der drei Kokzidiostatika deutlich reduziert, ebensowenig wie durch den Einbau der Nukleinsäurevorstufen eine größere Hemmung der Parasitenvermehrung gegenüber der Wirtszellproliferation nachzuweisen war.

Aprinocid erwies sich als das in vitro verträglichste Kokzidiostatikum, das nur in Konzentrationen von 10–100 ppm einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen ausübte.

In hohen Dosierungen war die Lebensfähigkeit der mit Aprinocid behandelten Zellen größer als die der mit Lasalocid und Salinomycin behandelten. Den in der Zählkammer festgestellten zellproliferationshemmenden Effekt besaßen die drei Kokzidiostatika bis zu Konzentrationen zwischen 10 ppm (Aprinocid) und 1 ppm (Lasalocid), während eine Hemmung im Einbau der Nukleinsäurevorstufen bei Lasalocid und Salinomycin bis zu der niedrigsten verwendeten Konzentration nachweisbar war.

Da die Kokzidiostatika Arprinocid, Lasalocid und Salinomycin nach meinen Untersuchungen zumindest in vitro keine in irgendeiner Form gegen Theilerien gerichtete Aktivität besitzen, ist im Gegensatz zu Bay g 7183 ein Einsatz im Tierversuch nicht zu empfehlen.

Sicher ist es nicht möglich, in einer Zellkultur die Verhältnisse im Tier zu simulieren, fehlen doch die die Pharmakokinetik und -dynamik bestimmenden Um- und Abbauvorgänge ebenso wie Möglichkeiten der Ausscheidung. Die Aktivität eines erst als Metaboliten wirksamen Chemotherapeutikums wird folglich nicht erfaßt. In vitro-Versuche liefern also grundsätzlich nur vorläufige Ergebnisse, die auch im Widerspruch zu den Erfahrungen aus einem Tierversuch stehen können. So konnte HAWKING (1963) bei allen von ihm verwendeten Substanzen gegen Theileria-Schizonten in vitro in keinem Fall eine Wirkung nachweisen, obwohl einige der Substanzen von anderen Autoren im Tierversuch als theilerizid bezeichnet worden waren. Auch die von RAKHIMOV und SHMUNK (1974) angegebene, gegen eine Theileria annulata-Infektion wirksame Kombination einiger pharmakologisch wirksamer Substanzen (Mepacrin, Proguanil, Plasmocid, Chloroquin) erwies sich in vitro als unwirksam (McHARDY, 1978). Dagegen zeigten die bei Theileria annulata-Infektionen unbestritten am wirksamsten Chemotherapeutika Parvaquone und Halofuginon auch in vitro einen schizontoziden Effekt. Insgesamt ist das "screening" von Substanzen in vitro im Vergleich zum Tierversuch schneller, finanziell weniger aufwendig und auch unter tierschützerischen Gesichtspunkten zu bevorzugen. Selbstverständlich kann im Falle positiver Ergebnisse auf den Tierversuch nicht verzichtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß 6 verschiedener Chemotherapeutika auf die Schizonten von *Theileria annulata* und die lymphoblastoiden Wirtszellen untersucht. Zur Anwendung kamen Arprinocid, Lasalocid, Salinomycin, Bay g 7183, Parvaquone (993C) und Halofuginon in Form von 3 Salzen. Die Wirkung der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen wurde nach jeweils 24-, 48- und 72stündiger Inkubation anhand von 5 Parametern, nämlich Lebensfähigkeit, Zellwachstum, Schizontenindex (Prozentsatz infizierter Zellen) und Hemmung des ^3H -Thymidin- und des ^3H -Hypoxanthineinbaus überprüft. Der ^3H -Thymidineinbau ist dabei proportional zur Wirtszellproliferation, während die ^3H -Hypoxanthininkorporation mit der Vermehrung der *Theileria annulata*-Schizonten korreliert.

Bei Konzentrationen im Bereich von 100 ppm bis 0,5 ppm bewirkten die meisten Therapeutika eine Schädigung sowohl der Schizonten wie auch der Wirtszellen. Nur Halofuginon und Parvaquone zeigten eine deutliche selektive Wirkung. In einer Konzentration von 1 ppm reduzierte Parvaquone den Schizontenindex von 84% (Kontrollzellen) auf 28%. Von den Salzen des Halofuginon zeigte das Lactat in einer Konzentration von 0,025 ppm die beste Wirkung, es führte zu einer Reduktion des Schizontenindex von 82% auf 42%. Eine ausgeprägtere Hemmung des Einbaus von ^3H -Hypoxanthin im Vergleich zu ^3H -Thymidin war ebenfalls nach Inkubation mit Halofuginon und Parvaquone festzustellen. Bay g 7183 zeigte in Konzentrationen zwischen 1 ppm und 50 ppm zwar gleichfalls eine deutlich größere Hemmung des ^3H -Hypoxanthineinbaus, führte aber nicht zu einer Reduktion des Schizontenindex. Diese Substanz scheint also eine theileriostatische Wirkung zu haben.

SUMMARY

The influence of 6 chemotherapeutics on the schizonts of *Thellieria annulata* and the lymphoblastoid host cells was investigated in vitro. The effect of Arprinocid, Lasalocid, Salinomycin, Bay g 7183, Parvaquone (993C) and three salts of Halofuginon was compared in various concentrations after 24, 48 and 72 hours of incubation. The comparison was based on viability, cell-growth, schizont index (percentage of infected cells) and inhibition of ^3H -Thymidin- and ^3H -Hypoxanthin-incorporation. While the uptake of ^3H -Thymidin is correlated to the proliferation of the host cells, the ^3H -Hypoxanthin-incorporation corresponds to the proliferation of the *Thellieria annulata*-schizonts.

With the exception of Halofuginon and Parvaquone the tested chemotherapeutics led to damage of schizonts and host cells in concentrations between 100 ppm and 0,5 ppm. Halofuginon and Parvaquone however showed a distinct selective effect on *Thellieria annulata* schizonts. In a concentration of 1 ppm Parvaquone reduced the schizont index from 84% (control cells) to 28%. Halofuginon-Lactat proved to be the most effective Halofuginon salt, causing a reduction of the schizont index from 82% to 42% in a concentration of 0,025 ppm. Furthermore, Halofuginon and Parvaquone induced a greater inhibition of ^3H -Hypoxanthin-incorporation compared to that of ^3H -Thymidin. Bay g 7183 also inhibited the uptake of ^3H -Hypoxanthin markedly when used in concentrations between 1 ppm and 50 ppm without affecting the schizont index. This may indicate that Bay g 7183 possesses a thellierostatic effect.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aichinger, G., A. Haberkorn, H. Kölling, E. Kranz, J. Reisdorf, J. Stotefuß (1978):
Anticoccidial activity of Bay g 7183.

Fourth Int. Congr. Parasit., Sect. D, 19 - 26 August 1978, Warsaw

Awad, F.I. (1962): Combined chemotherapy of *Gonderia annulata* infection in
cattle.

Zbl. Vet. Med. 2, 52 - 58

Barnett, S.F. (1968): Theileriasis.

In: Weinmann, D., M. Ristic, Infectious blood diseases of man and animals.

Vol. II: The pathogens, the infections, and the consequences, 269 - 328,

Academic Press, New York

Barnett, S.F., K.P. Bailey (1958): Immunisation against East Coast fever with
Aureofac.

Ann. Rep. E. Afr. Vet. Res. Org., 1956 - 1957, 47

Berger, J., A.J. Rachlin, W.E. Scott, L.H. Sternbach, M.W. Goldberg (1951):

The isolation of three new crystalline antibiotics from streptomycetes.

J. Am. chem. Soc., 73, 5295 - 5298

Brocklesby, D.W., K.P. Bailey (1962): Therapeutic activity of Oxytetracycline
hydrochloride in East Coast fever.

Br. vet. J. 118, 81 - 85

Brocklesby, D.W., K.P. Bailey (1965): The immunisation of cattle against East
Coast fever (*Theileria parva* infection) using Tetracyclines: A review of the
literature and a reappraisal of the method.

Bull. epizoot. Dis. Afr. 13, 161 - 168

Brocklesby, D.W., F. Hawking (1958): Growth of *Theileria annulata* and *Theileria*
parva in tissue culture.

Trans. Soc. trop. Med. Hyg. 53, 414 - 420

- Brown, C.G.D., D.E. Radley, M.J. Burridge, M.P. Cunningham (1977a):
The use of Tetracyclines in the chemotherapy of experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle).
Tropenmed. Parasit. 28, 513 - 520
- Brown, C.G.D., D.E. Radley, M.P. Cunningham, I.M. Kirimi, S.P. Morzaria, A.J. Musoke (1977b): Immunisation against East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle) by infection and treatment: Chemoprophylaxis with N-pyrrolidinomethyl Tetracycline.
Tropenmed. Parasit. 28, 542 - 548
- Büngener, W., G. Nielsen (1967): Nukleinsäurenstoffwechsel bei experimenteller Malaria.
Z. Tropenmed. Parasit. 18, 456 - 462
- Chappel, L.R., W.E. Babcock (1979): Field trials comparing Salinomycin (Coxistac), Monensin and Lasalocid in the control of coccidiosis in broilers.
Poult. Sci. 58, 304 - 307
- Chou, T.Q. (1954): Untersuchung einiger chinesischer Drogen.
Pharmazie 9, 688 - 691
- Cordier, G., G. Gayot (1954): Recherches sur la thellériose à *Theileria dispar*.
I. Insuccès de la thérapeutique curative par l'aureomycin.
Rec. med. vét. 130, 429 - 433
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 24, 651 (1954)
- Danforth, H.R., M.D. Ruff, W.M. Reid, R.L. Miller (1977): Anticoccidial activity of Salinomycin in battery raised broiler chickens.
Poult. Sci. 56, 926 - 932
- Dschunkowsky, E., J. Luhs (1904): Die Piroplasmose der Rinder.
Centbl. Bakt. Parasitkde Abt. I 35, 486 - 491

- Dyke, K. van (1975): Comparison of tritiated Hypoxanthine, Adenin and Adenosine for Purin-salvage incorporation into nucleic acids of the malarial parasite, *Plasmodium berghei*.
Tropenmed. Parasit. 26, 232 - 238
- El Refail, A.H., S.A. Michael (1976): The application of Imidocarb dipropionate for the control of *Theileria annulata* infection in egyptian cattle used for testing Rinderpest vaccine.
Br. vet. J. 132, 363 - 368
- Ende, M. van den, E. Edlinger (1971): Culture de lignées lymphocytaires bovines infectées par *Theileria annulata*.
Archs Inst. Pasteur Tunis 48, 45 - 54
- Fitzgerald, P.R., M.E. Mansfield (1979): Efficacy of Lasalocid against coccidia in cattle.
J. Parasit. 65, 824 - 825
- Foreyt, W.J., N.L. Gates, R.B. Wescott (1979): Effects of Lasalocid and Monensin against experimentally induced coccidiosis in confinement reared lambs from weaning to market weight.
Am. J. vet. Res. 40, 97 - 100
- Giesecke, W., E. Wiesenhütter (1965): Zur Klinik und Therapie der *Theileria annulata*-Infektion der Rinder in Syrien.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 78, 123 - 125
- Gill, B.S., Y. Bhattacharyulu, D. Kaur (1976): Immunisation against bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection).
Res. vet. Sci. 21, 146 - 149
- Greuel, E., W. Raether (1980): Kokzidiostatischer Effekt von Salinomycin gegen verschiedene Elmeriaarten des Huhnes unter experimentellen Bedingungen.
Prakt. Tierarzt 61, 244 - 250

- Haberkorn, A., H.P. Schulz (1981): Experimental chemotherapy of mammalian coccidiosis with Bay g 7183.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 250, 260 - 267
- Hashemi-Fesharki, R., F. Shad-Del (1974): The therapeutic value of Oxytetracycline hydrochloride (Terramycin) in cattle infected experimentally with *Theileria annulata*.
Trop. Anim. Hlth Prod. 6, 119 - 121
- Hawking, F. (1958): Chemotherapeutic screening of compounds against *Theileria annulata* in tissue culture.
Br. J. Pharmac. 13, 458 - 460
- Hawking, F. (1963): Chemotherapy of theileriosis, 625 - 632
In: Experimental chemotherapy, Vol. 1, Academic Press, New York
- Heydorn, A.O., S. Haralambidis, F.-R. Matuschka (1981): Zur Chemoprophylaxe und Therapie der akuten Sarkosporidiose.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 229 - 234
- Hoshmand-Rad, P. (1975): The growth of *Theileria annulata* infected cells in suspension culture.
Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 23 - 28
- Hulliger, L. (1965): Cultivation of three species of *Theileria* in lymphoid cells in vitro.
J. Protozool. 12, 649 - 655
- Hulliger, L., J.K.H. Wilde, C.G.D. Brown, C. Turner (1964): Mode of multiplication of *Theileria* in cultures of bovine lymphocytic cells.
Nature, Lond. 203, 728 - 730
- Irvine, A.D., D.A. Stagg (1977): *Theileria parva*: Purine and Pyrimidine metabolism and the action of folate antagonists in parasitized bovine lymphoid cells.
Expl Parasit. 41, 172 - 185

- Irvin, A.D., E.R. Young (1977): Possible in vitro test for screening drugs for activity against *Babesia* and other blood protozoa.
Nature, Lond. 269, 407 - 409
- Irvin, A.D., E.R. Young (1979): Further studies of the uptake of tritiated nucleic acid precursors by *Babesia* spp. of cattle and mice.
Int. Parasit. 9, 109 - 114
- Irvin, A.D., E.R. Young, R.E. Purnell (1978): The in vitro uptake of tritiated nucleic acid precursors by *Babesia* spp. of cattle and mice.
Int. Parasit. 8, 131 - 138
- Irvin, A.D., C.D.H. Boarer, T.J. Kurtti, J.G.R. Orama (1981): The incorporation of radio-labelled nucleic acid precursors by *Theileria parva* in bovine blood and salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks.
Int. Parasit. 11, 451 - 456
- Jarrett, W.F.H., M.H. Pirie, N.C.C. Sharp (1969): Immunisation against ECF using tick infections and Chlortetracyclines.
Expl Parasit. 24, 147 - 151
- Joyner, L.P., D.W. Brocklesby (1973): Chemotherapy of anaplasmosis, babesiasis and theileriasis.
Adv. Pharmac. Chemother. 11, 321 - 355
- Kaemmerer, K., J. Fink (1978): Untersuchungen der Ionophoren Kokzidiostatika am Herzen des Huhnes.
Dt. Tierärztl. Wschr. 85, 216 - 220
- Kaemmerer, K., M.-J. Seidler (1976): Untersuchungen des gegen Kokzidien wirkenden Stenoral auf teratogene Effekte bei Ratten.
Arch. Geflügelkd. 4, 140 - 146

Kilgore, R.L., R.G. Bramel, E.S. Brocken, G. Olson, J.L. Cox, W.H.D. Leaning (1978):
Efficacy of Aprinocid (MK-302) against *Eimeria* species in broilers.
Poult. Sci. 57, 907 - 911

Kinashi, H., H. Take, H. Yonehara (1973): The structure of Salinomycin, a new
member of the polyether antibiotics.
Tetrahedron Lett. 49, 4955 - 4958

Koepfli, J.B., J.F. Mead, J.A. Brockman (1949): An alkaloid with high antimalarial
activity from *Dichroa febrifuga*.
J. Am. chem. Soc. 69, 1837

Kuehl, F.A., C.F. Spencer, K. Folkers (1948): Alkaloids of *Dichroa febrifuga* Lour.
J. Am. chem. Soc. 70, 2091 - 2093

Lablin, Ch. (1978): Klinische Untersuchungen zur *Theileria annula*-Infektion des
Rindes.
II. Hämatologische Untersuchungen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 48 - 50

Malmquist, W.A., M.B.A. Nyindo, C.G.D. Brown (1970): East Coast fever:
Cultivation in vitro of bovine spleen cell lines infected and transformed by
Theileria parva.
Trop. Anim. Hlth Prod. 2, 139 - 145

Manuel, M.F., E. Troveia (1977): Further studies on the prophylactic value of
Halofuginone and Furazolidone against Leucocytozoonosis in chickens.
Philipp. J. vet. Med. 16, 20 - 30

McHardy, N. (1978): In vitro studies on the action of Menoctone and other
compounds on *Theileria parva* and *Theileria annulata*.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 501 - 511

McHardy, N. (1979): Experimental therapy of theileriosis.
JI S. Afr. vet. Ass. 50, 321 - 322

- McHardy, N., A.J.B. Haigh, T.T. Dolan (1976): Chemotherapy of *Theileria parva* infection.
Nature, Lond. 261, 698 - 699
- McManus, E.C., J.E. Brown, D.W. Graham, G. Olson, E.F. Rogers, T. Tamas (1976):
Anticoccidial battery studies in chicken fed MK-302.
Poult. Sci. 55, 2065
- Mehlhorn, H., U. Moltmann, E. Schein, W.P. Voigt (1981): Electron microscopical study on the effect of Halofuginone on *Theileria parva*.
Tropenmed. Parasit. 32, 231 - 233
- Melton, M.L., H.G. Sheffield (1975): Activity of the anticoccidial compound Lasalocid against *Toxoplasma gondii* in cultured cells.
J. Parasit. 61, 713 - 717
- Migaki, T.T., L.R. Chappel, W.E. Babcock (1979): Anticoccidial efficacy of a new polyether antibiotic, Salinomycin, in comparison to Monensin and Lasalocid in battery trials.
Poult. Sci. 58, 1192 - 1196
- Mitrovich, M., E.G. Schildknecht (1973): Anticoccidial activity of antibiotic X-537 A in chickens.
Poult. Sci. 52, 2065
- Mitrovich, M., E.G. Schildknecht (1974): Anticoccidial activity of Lasalocid (X-537 A) in chicks.
Poult. Sci. 53, 1448 - 1455
- Miyazaki, Y., M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, Ch. Hirose, J. Nagatsu, S. Esumi (1974): Salinomycin, a new polyether antibiotic.
J. Antibiot. 27, 814 - 821
- Morrison, W.D., A.E. Ferguson, S. Leeson (1979): Efficacy of Salinomycin and Stenorol against various species of *Eimeria* and effect on chick performance.
Poult. Sci. 58, 1160 - 1166

- Mutuzkina, Z.P. (1975): Cultivation of *Theileria annulata* in tissue culture.
Veterinariya, Moscow No. 4, 56 - 57
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 45, 741 (1975)
- Neltz, W.O. (1951): Chemotherapeutic studies on theileriasis in cattle.
S. Afr. Biol. Soc. 15, 50 - 51
- Neltz, W.O. (1953): Aureomycin in *Theileria parva* infection.
Nature, Lond. 171, 34 - 35
- Neltz, W.O. (1957): Theileriosis, gonderiosis, cytauxzoonoses.
Onderstepoort J. vet. Res. 27, 275 - 430
- Neltz, W.O. (1959): Theilerioses.
Adv. vet. Sci. V, 241 - 297
- Paul, John (1980): Zell- und Gewebekulturen, 30 - 31
Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Pereponov, G.A., P.A. Nechaev (1963): Treatment of *Theileria* infection in cattle
with Quinocide (Primaquine) combined with Bigumal (Mepacrine).
Mater. Konf. Probl. Prot. 82 - 84
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 34, 459 (1964)
- Perotto, J., D.B. Keister, A.H. Gelderman (1971): Incorporation of precursors into
Toxoplasma DNA.
J. Protozool. 18, 470 - 473
- Pinder, M., S. Kar, K.S. Withey, L.B. Lundin, G.E. Roelants (1981):
Proliferation and lymphocyte stimulatory capacity of *Theileria*-infected
lymphoblastoid cells before and after the elimination of the intracellular
parasites.
Immunology 44, 51 - 60

- Pipano, E. (1964): The treatment of experimental *Babesiella berbera* and *Theileria annulata* infections with 4'diazo-amino-dibenzamidine-diacetate.
Refuah vet. 21, 255 - 247
- Pipano, E. (1976): Basic principles of *Theileria annulata* control, 55 - 65
In: Henson, J.B., M. Campbell: Theileriosis. Report of a workshop held in Nairobi, Kenya 7-9 December 1976.
Int. Dev. Res. Centr. Ottawa, 1977
- Popov, Yu.A. (1969): Treatment and chemoprophylaxis of bovine theileriasis (*Th. annulata*; Diminazene plus Sulphadimidine).
Veterinariya, Moscow No. 7, 56 - 67
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 40, 98 (1970)
- Radkevich, P.E. (1960): Combined therapy with antibiotics and chemotherapeutic agents of *Theileria annulata* infection in cattle.
Veterinariya, Moscow No. 6, 23 - 25
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 31, 125 (1961)
- Radkevich, P.E. (1961): Specific and symptomatic therapy in *Theileria annulata* infection in cattle.
Veterinariya, Moscow No. 5, 26 - 28
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 31, 639 (1961)
- Radkevich, P.E. (1966): Pharmacotherapy of *Theileria annulata* infection in cattle.
Dokl. vses. Akad. sel'khoz. Nauk. No. 7, 41 - 42
Ref. L. Vet. Bull., Weybridge 37, 161 (1967)
- Radley, D.E. (1981): Infection and treatment method of immunisation against Theileriosis, 227 - 237.
In: Irvin, A.D., M.P. Cunningham, A.S. Young: Advances in the control of theileriosis. Proc. Int. Conf. Int. Lab. Res. Anim. Dis., Nairobi, 9-13 Februar 1981, Martinus, Nijhoff Publishers The Hague

- Radley, D.E., C.G.D. Brown, M.J. Burridge, M.P. Cunningham, I.M. Kirimi, R.E. Purnell, A.S. Young (1975): East Coast fever: 1. Chemoprophylactic immunisation of cattle against *Theileria parva* (Muguga) and five theilerial strains.
Vet. Parasit. 1, 35 - 41
- Rakhimov, T.Kh., E.K. Shmunk (1974): Treatment of theileriosis in animals.
Veterinariya, Moscow No. 10, 78 - 79
Ref. in Vet. Bull., Weybridge 45, 175 (1975)
- Ruff, M.D., W.L. Andersen, W.M. Reid (1978): Effect of the anticoccidial Aprinocid on production, sporulation and infectivity of *Eimeria* oocysts.
J. Parasit. 64, 306 - 311
- Ryley, J.F., R.G. Wilson (1975): Laboratory studies with some recent anticoccidials.
Parasitology 70, 203 - 222
- Samish, M., E. Pipano (1976): Transmission of *Theileria annulata* by two and three host ticks of the genus *Hyalomma* (Ixodidae). 371 - 372.
In: Wilde, J.K.A.: Tick borne diseases and their vectors.
Proc. Int. Conf., 27 September - 1 October 1976, Edinburgh.
Univ. Edinburgh, Centre for Trop. vet. Med., 1978
- Schein, E. (1976): Zum Entwicklungszyklus von *Theileria annulata* (Dschunkowsky und Luhs, 1904) in der Überträgerzecke *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844).
Habil. Schr., FU Berlin
- Schein, E., W.P. Voigt (1979): Chemotherapy of bovine theileriosis with Halofuginone.
Acta trop. 36, 391 - 394
- Schein, E., G. Büscher, K.T. Friedhoff (1975): Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von *Theileria annulata* (Dschunkowsky und Luhs) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). I Die Entwicklung im Darm vollgesogener Nymphen.
Z. Parasitkde 47, 165 - 167

Sergent, E., A. Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard (1945):

In: Études sur les piroplasmoses bovines.

Inst. Pasteur d' Algérie, 816 pp, Alger

Spooner, R.L., C.G.D. Brown (1980): Bovine lymphocyte antigens (BoLa) of bovine lymphocytes and derived lymphoblastoid lines transformed by *Theileria parva* and *Theileria annulata*.

Parasite Immun. 2, 163 - 174

Tamas, T., G. Olson, A. Smith, B.M. Miller (1978): Effect of 6-amino-9(substituted) benzy)purines on oocyst sporulation.

Poult. Sci. 57, 381 - 385

Tchernomoretz, I. (1947): Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*.

Refuah vet. 4, 63 - 51

Theiler, A. (1902): The rhodesian tick fever.

Transv. agric. J. 1, 93 - 110

Tsur, I. (1945): Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*.

Nature, Lond. 156, 391

Tsur, I., S. Adler (1962): Cultivation of *Theileria annulata* schizonts in monolayer tissue culture.

Refuah vet. 19, 225 - 224

Tsur, I., S. Adler (1965): The cultivation of lymphoid cells and *Theileria annulata* schizonts from infected bovine blood.

Refuah vet. 22, 62 - 60

Tsur, I., W.O. Neitz, I. Pols (1957): The development of Koch bodies of *Theileria parva* in tissue culture.

Refuah vet. 14, 53 - 51

- Uilenberg, G., F. Jongejan, N.M. Perie, F.F.J. Franssen (1980): Chimiotherapie des theilerioses bovines par un anticoccidien, l'Halofuginon.
Rev. Elev. Méd. vét. Pays. trop. 33, 33 - 43
- Wang, C.C., P.M. Simashkevich, P.L. Stotish (1979a): Mode of anticoccidial action of Arprinocid.
Biochem. Pharmac. 28, 2241 - 2248
- Wang, C.C., R.L. Tolman, P.M. Simashkevich, R.L. Stotish (1979b): Arprinocid, an inhibitor of hypoxanthine-guanine transport.
Biochem. Pharmac. 28, 2249 - 2260
- Wilde, J.K.H. (1967): East Coast fever.
Adv. vet. Sci. 11, 207 - 259
- Yvore, P., N. Foure, J. Aycardi, G. Bennejean (1974): Efficacité du StenoroI (RU 19110) dans le chimoprophylaxis des coccidioses aviaires.
Recl Med. vet. Ec. Alfort 150, 495 - 503
- Zablotskii, V.T. (1967): Use of tissue culture in the study of Theileria annulata.
Veterinariya, Moscow No. 2, 66 - 69
Ref. I. Vet. Bull., Weybridge 38, 447 (1968).

Herrn Prof. Dr. E. Schein danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. Hörchner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Beratung bei der Abfassung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J.S. Ahmed für die stets gewährte freundschaftliche Unterstützung bei den experimentellen Untersuchungen.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie, die mir bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben.

Zudem bedanke ich mich bei den Firmen Roussel-Uclaf, Wellcome Research Laboratories, Bayer, Merck, Sharpe & Dohme, Hoffmann LaRoche und Hoechst für die Bereitstellung der verwendeten Chemotherapeutika.

LEBENS LAUF

Gesa Kohlmeyer

- geboren : 29.12.1955 in Bremen
- Vater : Prof. Dr. Knut Kohlmeyer, Arzt
- Mutter : Dr. Ingrid Margarete Kohlmeyer, geb. Höcherl, Ärztin
- 1962 - 1963 : Besuch der Volksschule in Hamburg-Bahrenfeld
- 1963 - 1966 : Besuch der Pestalozzischule in Gießen
- 1966 - 1974 : Besuch der Ricarda Huch-Schule in Gießen
- Mai 1974 : Abitur
- 1974 - 1980 : Studium der Tiermedizin an der FU Berlin
- Februar 1980 : Ablegung des Staatsexamens und Approbation
als Tierärztin
- seit April 1982 : Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Parasitologie
und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin

